

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین

دانشکده پزشکی

رساله دکترای تخصصی پزشکی مولکولی

معاونت پژوهشی

عنوان طرح

آنالیز موتاسیون KRAS و تعیین میزان بیان ژن و ارزیابی ایمنوهیستوشیمی

پروتئین HIF1AN به عنوان بیومارکر پیش آگهی دهنده احتمالی

آدنوکارسینومای کولورکتال انسانی

اساتید راهنما:

آقای دکتر رضا نجفی پور- آقای دکتر ناصر رخشانی

اساتید مشاور:

آقای دکتر آرمان مرکباتی- آقای دکتر امیر جوادی

نگارش:

خانم لادن وکیل

شماره پایان نامه: ۶



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی

استان قزوین

بسمه تعالی

بدینوسیله گواهی می شود مراحل علمی و عملی پایان نامه دکتری تخصصی رشته پزشکی مولکولی با عنوان "آنالیز موتاسیون KRAS و تعیین میزان بیان ژن وارزیابی ایمنوهایستوشیمی پروتئین HIF1AN به عنوان بیومارکر پیش آگهی دهنده احتمالی آدنوکارسینومای کولورکتال انسانی" توسط سرکار خانم لادن وکیل به شماره دانشجویی ۸۹۱۱۹۴۰۰۲ به پایان رسیده است و صلاحیت علمی آن مورد تایید بوده و جهت ارائه در جلسه دفاع بلامانع است.



پروژه تخصصی پاتولوژی آناتومیکال - کلینیکال
نظام پزشکی ۸۴۲۱۰ - ۲۳۰۲

- | | |
|----------------------------|------------------|
| ۱- آقای دکتر رضا نجفی پور | استاد اول راهنما |
| ۲- آقای دکتر ناصر رخشانی | استاد دوم راهنما |
| ۳- آقای دکتر آرمان مرکباتی | استاد مشاور |
| ۴- آقای امیر جوادی | استاد مشاور |

آنالیز موتاسیون KRAS و تعیین میزان بیان ژن وارزیابی بافتی پروتئین HIF1AN به عنوان بیومارکر پیش آگهی دهنده احتمالی در آدنوکارسینومای کولورکتال انسانی

چکیده

سرطان کولورکتال (CRC) فرآیندی چند مرحله ای بر اساس تجمع جهش سوماتیک در ژن ها مثل APC و KRAS است. اطلاعات کمی مبنی بر جهش در ژن KRAS و ارتباط آنها با پارامترهای بالینی و بیان ژن های دخیل در پیشرفت تومور در CRC وجود دارد. ما وضعیت KRAS را در نمونه ۹۹ بیمار و ارتباط آن با پارامترهای کلینیکی مانند سن، جنس، محل تومور، متاستاز به غدد لنفاوی، مرحله تومور، درجه تومور و تهاجم عروقی مورد بررسی قرار دادیم. مطابق با گزارش های دیگر، 38/4٪ از نمونه های ما جهش در ژنوم KRAS را با جهش بیشتر در کدون ۱۲ (89/4٪) نشان داد. با این وجود، در تضاد با گزارش های قبلی، هیچ رابطه ای بین وضعیت KRAS و پارامترهای کلینیکی پاتولوژیک، به جز تهاجم عروقی دیده نشد. ($P>0/05$) بیماران مبتلا به جهش KRAS در مقایسه با بیمار نوع وحشی KRAS تهاجم عروقی بیشتر داشتند. سپس، ما بررسی بیان دو ژن سرکوبگر تومور، FIH-1 و SOCS3، در هر دو گروه KRAS جهش یافته و نوع وحشی به جستجوی ارتباط بین بیان و پارامترهای کلینیکی پاتولوژی پرداختیم. اگر چه بیان هر دو ژن بیان تنظیم نشده را نشان میداد، اما بیان FIH-1 و SOCS3 در سطح mRNA با هیچ کدام از پارامترهای کلینیکی پاتولوژی ارتباط نداشت. ($P>0/05$) با این حال، در گروه KRAS موتانت کاهش FIH-1 در سطح پروتئین با مرحله IV و گرید II تومور مرتبط بود. نتایج ما نشان داد که هیچ ارتباط و یا همبستگی پایینی میان وضعیت KRAS با بیان FIH-1 و SOCS3 و ویژگی های اپیدمیولوژیک و تظاهرات کلینیکی پاتولوژیکی در CRC وجود ندارد.

کلمات کلیدی: سرطان کولورکتال، جهش KRAS، FIH-1 و SOCS3

والاترین دوست و همراه زندگیم فدای مهربان تقدیم به بهترین و

تقدیم به فرشته بی همتای زندگیم که نور وجود نازنینش مایه دلگرمی و امید من
است و همواره آرامش مضورش، محبت و از خودگذشتگیهایش در ذهن و وجودم
مادرم سپاس جاودانه است.

تقدیم به روان شاد و پاک پدرم که افتخار داشتنش را ندارم اما همیشه دلسوزیها
دریغ که از موهبت وجودش بی نصیبم اما پدرم هنوز، وپندهایش در ذهنم فوادم ماند
نخواهات در گوش جانم زنگ می زند و

یقین دارم آمرزیده ای و آزاد، سیمایت در برابر چشمانم زنده است

تقدیم به همسر بسیار عزیزم که با بلندی طبع و محبت وجودش در تحقق آرزوهایم
همراه بوده و همیشه کامیابی من منتهای فواستش است

تقدیم به آبتین عزیزتر از جانم که به یمن مضور و عمق شعورش در طول این سالها
بهترین همراه و حامی من بود

تقدیم به پسر عزیز در راهم که وجود دوست داشتنی و نازنینش موهبت است

تقدیم به برادران عزیزم که مایه دلگرمی و افتخارم هستند

تقدیم به اساتید ارجمند و محترم (راهنما و مشاور

جناب آقای دکتر رضا نجفی پور جناب آقای دکتر ناصر رفشانی

جناب آقای دکتر آرمان مرکباتی جناب آقای دکتر امیر جوادی

تقدیم به اساتیدممتز ناظر جلسه دفاعیه

جناب آقای دکتر بهرام کاظمی جناب آقای دکتر بهرنگ کاظمی نژاد

جناب آقای دکتر ناصر پور جناب آقای دکتر ساروفانی

جناب آقای دکتر پیمانی جناب آقای دکتر سهمانی

با تقدیر و تشکر از

ریاست محترم دانشگاه علوم پزشکی قزوین

ریاست محترم دانشکده پزشکی علوم پزشکی قزوین

معاونت محترم پژوهشی و معاونت محترم آموزشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

دپارتمان پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

انستیتو تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

ریاست محترم بیمارستان فیروزگر دانشگاه علوم پزشکی ایران

معاونت محترم آموزشی و پژوهشی بیمارستان فیروزگر

انستیتو تحقیقات کبد و گوارش بیمارستان فیروزگر

ریاست محترم دیارتمان پاتولوژی بیمارستان مهر تهران

آزمایشگاه تشخیص مولکولی و پاتوبیولوژی پرتولب

, جناب آقای دکتر بابک قاری زاده , جناب آقای دکتر مهران قادری , سرکار خانم دکتر مهشید هورمزدی

جناب آقای مهندس فرهاد قجقی و کلیه همکاران محترم

جناب آقای دکتر حسینی راد , سرکار خانم دکتر الهه کاشانی امین

دفتر آموزش و تحصیلات تکمیلی سرکار خانم پورزرشکی و سرکار خانم شامخی و دفتر مجله علوم پزشکی

قزوین خانم خشکه چالی که نهایت همکاری و مساعدت را با اینجانب داشتند سپاسگزارم

خانم دکتر مریم هنردوست و خانم دکتر غزل محمدی که مایه , خانم دکتر اعظم رجب پور , دوستان عزیزم

دلگرمی و مشوق من بودند کمال تشکر و قدردانی را دارم

فهرست عناوین

۱-۱ بخش اول: مقدمه

۲	1-1-1 دستگاه گوارش
۲	2-1-1 روده بزرگ
۲	3-1-1 کولون
۴	4-1-1 رکتوم
۴	5-1-1 نئوپلاسم های روده بزرگ
۴	6-1-1 نئوپلاسم روده بزرگ
۵	2-1-2 کارسینوم کولورکتال
۵	1-2-1 اپیدمیولوژی
۶	2-2-1 اپیدمیولوژی سرطان کولورکتال در ایران
۶	3-2-1 اتیولوژی و ریسک فاکتورهای موثر در ابتلا به سرطان کولورکتال
۶	1-3-2-1 فاکتورهای محیطی
۷	2-3-2-1 عوامل وراثتی
۸	4-2-1 مرحله بندی کارسینوم کولون

۱۰	5-2-1 درجه بندی کارسینوم کولون
۱۰	6-2-1 علائم بالینی
۱۱	7-2-1 موفولوژی
۱۱	8-2-1 پیش آگهی
12	9-2-1 ژنتیک مولکولی کارسینوم کولون
۱۶	۱-۳-۱ سیگنالینگهای سلولی دخیل در پاتوژنز کارسینوم کولون
۱۸	۲-۳-۱ میتوزن اکتیویتد پروتئین کیناز سیگنالینگ (MAPK signaling pathway)
۱۹	۳-۳-۱ ساختار و نقش همولوگ انکوژن ویروس سارکوما رات کرسین
۱۹	۴-۳-۱ مراحل انتقال پیام رشد توسط EGFR در MAPK signaling pathway
۲۱	۵-۳-۱ نقص در مسیرهای انتقال پیام به سرطان
۲۲	۶-۳-۱ KRAS ژن و نقش آن در سرطان کولورکتال
۲۳	۷-۳-۱ جهش ^۱ ، تقویت ژنی ^۲ و تعداد نسخه های ژن ^۳ KRAS
۲۵	۱-۴-۱ سیگنالینگ ژانوس کیناز و هدایت سیگنال و فعال کننده نسخه برداری
۲۵	۲-۴-۱ تنظیم سیگنالینگ JAK-STAT3
۲۶	۳-۴-۱ سیگنالینگ JAK-STAT در کانسر کولون

۲۷	۱-۵-۱ تعریف نورموکسی و هیپوکسی
۲۷	۱-۵-۲ علل فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی هیپوکسی
۲۹	۱-۵-۳ فاکتورهای محرک هیپوکسی
۳۰	۱-۵-۴ ژنهای هدف فاکتور القا کننده هیپوکسی
۳۰	۱-۵-۵ "فاکتور مهار کننده HIF1 Factor Inhibiting (HIF1AN)
۳۱	۱-۵-۶ نقش آسپاراژیل و پرولیل هیدروکسیلازها در ناپایداری HIF
۳۲	۱-۵-۷ جایگاه سلولی و ساختار (FIH1)HIF1AN
۳۳	۱-۵-۸ انواع تنظیم سلولی HIF1AN (FIH1)
۳۳	۱-۵-۹ نقش HIF1AN در تومور های جامد
۳۵	۱-۵-۱۰ الگوی بیان فاکتور HIF1AN در انواع سرطانهای انسانی
۳۶	۱-۶-۱ مروری بر مطالعات گذشته
۳۸	اهداف و فرضیات
	۲-۱ بخش دوم : مواد و روش
۴۰	۲-۱-۱ دستگاه ها و وسایل مورد استفاده
۴۲	۲-۱-۲ مواد و محلول های مورد استفاده

۴۳	۲-۲ تخلیص DNA توسط کیت (50) QIAamp DNA FFPE Tissue Kit
۴۴	۳-۲ پایرووسکوئسنسینگ Pyrosequencing
۴۵	۱-۳-۲ پروتکل اول : تکثیر اولیه از ژن KRAS با استفاده از معرف های Pyro kit
۴۷	۲-۳-۲ پروتکل دوم: اتصال آمپلیکون های حاوی بیوتین به بید های استراپتاویدین سفارز
۴۷	۳-۳-۲ پروتکل سوم : آماده ساز محلولها جهت پایرو سکونسنسینگ
۴۸	۴-۳-۲ پروتکل چهارم : تک رشته ای کردن DNA
۴۹	۵-۳-۲ پروتکل پنجم: راه اندازی سکونسر و انجام سکانس
۵۰	۶-۳-۲ سفارش توزیع وکلئوتیدها Dispensation Order
۵۰	۴-۲ تخلیص RNA
۵۰	۱-۴-۲ ایزولاسیون RNA از بافت فیکس شده با فرمالین RNasy FFPE Kit QIAGEN
۵۲	۲-۴-۲ طراحی پرایمر ژن های FIH1 ، SOCS3 ، HPRT با استفاده از نرم افزار
۵۳	۳-۴-۲ طول قطعه و جایگاه طراحی پرایمر بر اساس بانک ژن
۵۴	۴-۴-۲ مواد و محلول های مورد استفاده در 1 st strand cDNA
۵۵	۵-۴-۲ مواد و محلول های مورد استفاده در Real Time PCR
۵۷	۵-۲ روش اجرای ایمنوهیستوشیمی

۱-۵-۲ مرحله دیپارافینه کردن

۵۸

۵۸ ۲-۵-۲ مرحله بازیافت آنتی ژن و رنگ آمیزی با DAB کروموژن

۶۰ ۶-۲ نحوه شمارش و امتیازدهی اسلاید ها (SCORING)

۷-۲ نحوه محاسبه تغییرات نسبی بیان ژن

60

۶۱ ۸-۲ آنالیز آماری

۱-۳ بخش سوم: نتایج

۶۳ ۱-۳) استخراج DNA نمونه FFPE و تایید آن بر روی ژل الکتروفورز

۶۴ ۲-۳) تکثیر DNA ژن KRAS و توالی یابی به روش پائروسکوئسنینگ

۶۵ ۳-۳) توالی یابی قطعه آمپلیکون ژن KRAS و تعیین موتاسیون به روش پائروسکوئسنینگ

۶۷ ۴-۳) نتایج تکثیر اختصاصی آمپلیکون های ژن های هدف به روش Real Time PCR

۶۸ ۱-۴-۳) نتایج و مقادیر Ct تکثیر اختصاصی آمپلیکون های ژن های هدف به روش qPCR

۶۹ ۵-۳) ژل الکتروفورز از محصول Real Time PCR ژن SOCS3

۷۰ ۶-۳) ژل الکتروفورز از محصول Real Time PCR ژن FIH1

۷۱ ۷-۳) ژل الکتروفورز از محصول Real Time PCR ژن HPRT

۳-۸) یافته های ایمنوهیستوشیمی

۷۲

۷۵

۳-۹) نتایج آنالیز آماری

4-1 بخش چهارم: بحث

فهرست اشکال و جداول

بخش اول: مقدمه

- ۱-۱: شکل شماتیک نواحی مختلف روده بزرگ ۳
- ۲-۱: شکل سیر تکاملی سرطان کولورکتال در مدل خطی توالی آدنوم-کارسینوم ۱۵
- ۳-۱: شکل مسیر میتوزن اکتیویتد سیگنالینگ MAPK در سرطان کولورکتال ۱۷
- ۴-۱: شکل مسیر سیگنالینگ JAK-STAT و مکان ارتباط با مسیر MAPK ۱۷
- ۵-۱: شکل مسیر سیگنالینگ هیپوکسی و امکان ارتباط با مسیر MAPK ۱۷
- ۶-۱: شکل تغییرات گوناگون ژنتیکی در مراحل مختلف ایجاد بدخیمی ۱۹
- ۷-۱: شکل مکانیسم اثر RAS موتانت در تکثیر سلول سرطانی ۲۱
- ۸-۱: شکل ساختار همولوگ انکوژن ویروس سارکومای رات کرسین KRAS ۲۲
- ۹-۱: شکل شکست مهار کننده های ضد EGFR در درمان سرطان کولون KRAS موتانت ۲۴
- ۱۰-۱: شکل ساختار دومین های پروتئین socs3 ۲۶
- ۱۱-۱: شکل اجزای مسیر JAK-STAT و نحوه فعال شدن و مهار شدن مسیر ۲۷
- ۱۲-۱: شکل ساختار دومین های پروتئین FIH1 ۳۰
- ۱۳-۱: شکل نقش FIH1 و دیگر مهار کننده های HIF در شرایط هیپوکسی ۳۲

بخش دوم : مواد و روش

۴۵	۱-۲) شکل شماتیک از روش پایروسکوئنسینگ
۴۵	۲-۲) شکل نحوه اتصال پرایمر های فرادست و فرودست بیوتنیل
۴۶	۱-۲) جدول مقادیر مورد نیاز در PCR
۴۶	۲-۲) جدول مقادیر مورد برنامه PCR
۴۷	۳-۲) جدول مواد و محلول مورد نیاز جهت اتصال DNA به بید های استراپتاویدین
۴۸	۴-۲) جدول نمونه رقیق سازی پرایمر های سکانس
۴۹	۳-۲) شکل دستگاه خلا و چاهک های حاوی اتانل بافر شستشو و بافر دناچوریشن
۵۲	۵-۲) جدول سکانس های پرایمر سه ژن FIH1 ,SOCS3 , HPRT
۵۲	۴-۲) شکل نمای پلیت PCR و نحوه قرارگیری نمونه کنترل منفی
۵۴	۶-۲) جدول ترکیبات تشکیل دهنده واکنش سنتز 1 st strand cDNA
۵۵	۷-۲) جدول برنامه RT-PCR مورد استفاده در سنتز DNA تک رشته ای
۵۶	۸-۲) جدول مواد و محلول مورد استفاده در واکنش Real Time PCR
۵۶	۹-۲) جدول برنامه PCR مورد استفاده در بررسی بیان ژن mRNA
61	۵-۲) شکل نمای شماتیک نحوه محاسبه مقدار بیان ژن

بخش سوم: نتایج

- ۶۳ (۱-۳) شکل استخراج DNA نمونه FFPE و تایید آن بر روی ژل الکتروفورزیس
- ۶۴ (۲-۳) شکل تایید تکثیر DNA ژن KRAS با استفاده از PCR
- ۶۵ (۳-۳) شکل نتایج دستگاه توالی یابی (پایروسکونئسینگ) به صورت جدول و گراف پایروگرام
- ۶۶ (۱-۳-۳) شکل انواع موتاسیون شایع ژن KRAS و فراوانی آن ها
- ۶۷ (4-۳) شکل گراف مربوط به منحنی ذوب SOCS3 , FIH1 , HPRT و گراف Ramp Rate
- ۶۸ (۱-۴-۳) شکل عکس مربوط به نمودار تکثیر و نتایج RealTimePCR مربوط به نمونه بیماران
- ۶۹ (۵-۳) شکل عکس ژل از محصول Real Time PCR ژن SOCS3
- ۷۰ (۶-۳) شکل عکس ژل از محصول Real Time PCR ژن FIH1
- ۷۱ (۷-۳) شکل عکس ژل الکتروفورز از محصول Real Time PCR ژن HPRT
- ۷۱ (۸-۳) شکل رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی مارکر HIF1AN سرطان پستان انسانی
- ۷۳ (۹-۳) شکل بافت توموری نمونه های KRAS wild
- ۷۳ (۱۰-۳) شکل بافت نمونه های KRAS Mutant
- ۷۴ (۱۱-۳) شکل ایمنوهیستوشیمی پروتئین FIH1
- ۷۹ (۱-۳) جدول توزیع فراوانی جنسیت افراد مورد مطالعه
- ۷۹ (۲-۳) جدول توزیع فراوانی شیوع موتاسیون ژن KRAS در افراد مورد مطالعه
- ۸۰ (۳-۳) جدول توزیع فراوانی درجه تمایز سلولهای تومور

۸۰	۴-۳) جدول توزیع فراوانی مرحله پیشرفت تومور (Stage) تومور
۸۱	۵-۳) جدول توزیع فراوانی محل تومو آدنوکارسینوم
۸۱	۶-۳) جدول توزیع فراوانی تهاجم عروقی تومور آدنوکارسینوم
۸۲	۷-۳) جدول توزیع فراوانی سن افراد مورد مطالعه
۸۲	۸-۳) جدول توزیع فراوانی انواع موتاسیون ژن KRAS
۸۳	۹-۳) جدول توزیع فراوانی محل تومور آدنوکارسینوم در دو گروه KRAS
۸۴	۱۰-۳) جدول توزیع فراوانی درجه تمایز تومور آدنوکارسینوم در دو گروه KRAS
۸۴	۱۱-۳) جدول توزیع فراوانی مراحل پیشرفت تومور آدنوکارسینوم مورد مطالعه در دو گروه KRAS
85	۱۲-۳) جدول توزیع فراوانی تهاجم عروقی در تومور آدنوکارسینوم مورد مطالعه در دو گروه KRAS
۸۶	۱۳-۳) جدول توزیع فراوانی انواع موتاسیون ژن KRAS و جنسیت بیماران
	۱۴-۳) جدول میزان بیان پروتئین FIH1 به روش IHC و بیان mRNA دو ژن FIH1 و SOCS3 در دو گروه KRAS به تفکیک در تومور مرحله Stage 1
۸۷	
	۱۵-۳) جدول میزان بیان پروتئین FIH1 به روش IHC و بیان mRNA دو ژن FIH1 و SOCS3 در دو گروه KRAS به تفکیک در تومور مرحله Stage 2
۸۷	

۱۶-۳) جدول میزان بیان پروتئین FIH1 به روش IHC و بیان mRNA دو ژن FIH1 و SOCS3 در دو گروه

KRAS به تفکیک در تومور مرحله Stage 3

۸۸

۱۷-۳) جدول میزان بیان پروتئین FIH1 به روش IHC و بیان mRNA دو ژن FIH1 و SOCS3 در دو گروه

KRAS در تومور مرحله (Stage 4)

۸۸

۱۸-۳) جدول میزان بیان پروتئین FIH1 به روش IHC و بیان mRNA دو ژن FIH1 و SOCS3 در دو گروه

KRAS در تومور های با درجه تمایز خوب (grade1)

۸۹

۱۹-۳) جدول میزان بیان پروتئین FIH1 به روش IHC و بیان mRNA دو ژن FIH1 و SOCS3 در دو گروه

KRAS در تومور های با درجه تمایز متوسط (grade 2)

۸۹

۲۰-۳) جدول میزان بیان پروتئین FIH1 به روش IHC و بیان mRNA دو ژن FIH1 و SOCS3 در دو گروه

KRAS در تومور های با درجه تمایز ضعیف (grade3)

۹۰

۲۱-۳) جدول میزان بیان پروتئین FIH1 به روش IHC و بیان mRNA دو ژن FIH1 و SOCS3 در دو گروه

KRAS که در تهاجم عروقی در آنها دیده نشد

۹۱

۲۲-۳) جدول میزان بیان پروتئین FIH1 به روش IHC و بیان mRNA دو ژن FIH1 و SOCS3 در دو گروه

KRAS که در تهاجم عروقی در آنها دیده شد

۹۱

۲۳-۳) جدول میزان بیان پروتئین و میزان تغییرات نسبی بیان ژن FIH1 در دو گروه KRAS

۹۲ ۲۴-۳) جدول آزمون آماری همبستگی بین مقادیر بیان FIH1

در دو سطح mRNA و پروتئین ۹۲

۹۳ ۳-۱۱) شکل نموداری بیان FIH1 و SOCS3 در دو گروه KRAS و ارتباط آنها با مرحله تومور

۹۳ ۳-۱۲) شکل نموداری بیان FIH1 و SOCS3 در دو گروه KRAS و ارتباط آنها با تمایز تومور

۳-۱۳) شکل نمودار بیان FIH1 و SOCS3 در دو گروه KRAS و ارتباط آنها با تهاجم عروقی

۹۴

۳-۱۴) شکل بیان پروتئین FIH1 در دو KRAS به روش

IHC ۹۴

۳-۲۵) جدول جایگزینی های نوکلئوتیدی و اسید آمینه مربوطه آن

۹۵

۳-۱۵) شکل نمای پایروگرام ژن KRAS چند بیمار

۹۶

بخش چهارم: بحث

۳-۱) شکل نمودار نقش فاکتور FIH1 در کانسر کولون ۱۰۳

فصل اول

کلیات

۱-۱ بخش اول: مقدمه

۱-۱-۱ دستگاه گوارش

مجرای گوارش (GI)^۴ از دهان تا مقعد گسترده است و شامل بخش های دهان، مری، معده، روده باریک و روده بزرگ می باشد. این ارگانه توسط اسفنگترهای اختصاصی که به طور مستقلی کنترل می شوند، از یکدیگر متمایز می گردند. دستگاه گوارش دو عملکرد اصلی و مهم را برعهده دارد که شامل جذب مواد غذایی و حذف مواد زائد است. دیواره دستگاه گوارش به لحاظ بافت شناسی از لایه مخاطی، لایه عضلات صاف و لایه صفاقی تشکیل شده است. (۱)

۲-۱-۱ روده بزرگ

روده بزرگ عضوی از دستگاه گوارش تحتانی می باشد که از سکوم، کولون، رکتوم و آنال کانال تشکیل شده است و تقریباً ۱/۵ متر طول دارد. وظیفه روده بزرگ، جذب آب و یون ها و تشکیل مواد دفعی است و از چهار لایه مخاط، زیر مخاط، طبقه عضلات و سرور تشکیل شده است. سطح مخاط روده بزرگ صاف و فاقد چین های حلقوی و پرز است. عضلات طولی خارجی به جز در بخش های رکتوم، آنال کانال و آپاندیس به صورت نوار ضخیم به نام تنیا کولی دیده می شوند. بین روده کوچک و سکوم در روده بزرگ، دریچه ایلئوسکال وجود دارد که به صورت اسفنگتری فیزیولوژیک مانع از بازگشت محتویات سکوم به روده کوچک می شود. (۲)

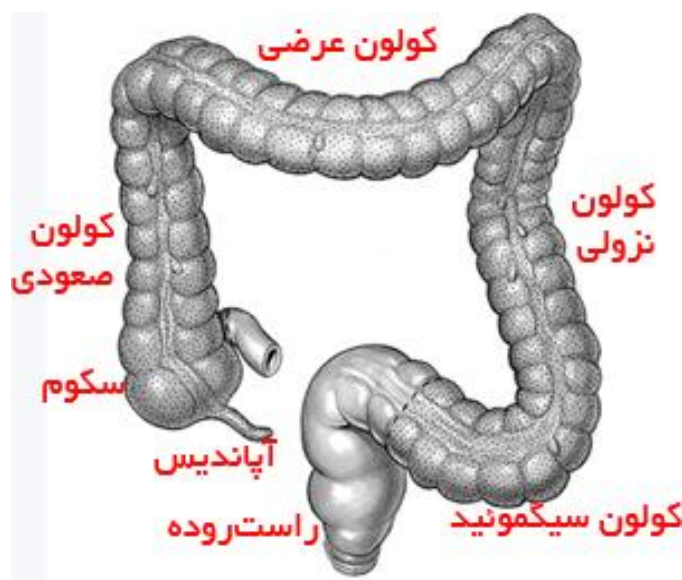
۳-۱-۱ کولون

کولون بخشی از روده بزرگ است که شامل کولون صعودی (راست)، کولون عرضی، کولون نزولی (چپ) و کولون سیگموئید می باشد. جدار کولون از ۴ لایه مخاط، زیرمخاط، لایه عضلانی خارجی (پروپریا) و سرور تشکیل شده و مخاط آن از سه جزء اپی تلیوم، لامینا پروپریا و موسکولاریس موکوزا ساخته شده است. سطح خارجی کولون، توسط لایه منفردی از سلول های اپی تلیوم استوانه ای مکعبی کوتاه پوشیده شده است.

^۴Gastro Intestinal

این اپی تلیوم سطحی از سلول هایی که هسته آن ها در قاعده قرار دارند و سیتوپلاسم آن ها اسیدوفیلیک و موسین منفی است تشکیل شده اند. حاشیه مخطط این سلول ها در راس به سمت لومن قرار دارد و وجود سلول های گابلت در لایه مخاط موجب سنتز، ذخیره و ترشح گرانولهای موسین در این لایه می گردد.

کولون فاقد چربی و دارای کریپت های لیبرکون فراوانی است. در پوشش غدد کولون، سلول های پانت وجود ندارند ولی تعداد سلول های گابلت از سکوم تا سیگموئید افزایش می یابند. در اپیتلیوم سطحی، بیشتر سلول ها جاذب هستند و سلول های انتراندوکرین به میزان کمی وجود دارند. آستر مخاط و زیر مخاط در کولون ساختمانی مشابه روده کوچک دارند و روزانه حدود ۱۴۰۰ میلی لیتر آب و الکترولیت در این بخش از دستگاه گوارش جذب می شود. (2, 3)



شکل ۱-۱: نمای شماتیک نواحی مختلف روده بزرگ (۳)

۴-۱-۱ رکتوم

رکتوم ۸ تا ۱۵ سانتی متری انتهای کولون را تشکیل می‌دهد که در لگن واقع شده و در محل کانال مقعد، پایان می‌یابد. ساختمان رکتوم نیز مشابه کولون است ولی کریپت‌های لیبرکون آن کم عمق تر هستند و در نیمه انتهایی آنال کانال محو می‌گردند. مخاط رکتوم دارای چین‌های طولی به نام ستون‌های آنال است. انتهای تحتانی چین‌های رکتوم به یکدیگر می‌پیوندند و دریچه‌های آنال را بوجود می‌آورند. (۱، ۴)

۵-۱-۱ نئوپلاسم‌های دستگاه گوارش

انواع بدخیمی‌های دستگاه گوارش به دو دسته نئوپلاسم‌های دستگاه گوارش فوقانی و تحتانی تقسیم می‌شوند. نئوپلاسم‌های گوارشی فوقانی شامل انواع سرطان‌های مری و معده بوده و بدخیمی‌های گوارشی تحتانی شامل انواع پولیپها و کارسینوم‌های روده‌ای، سندروم‌های پولیپوز و تومورهای کارسینوئید می‌باشند. با این وجود، روده بزرگ از شایعترین محل‌های بروز بدخیمی‌های دستگاه گوارش تحتانی بوده و بیش از بخش‌های دیگر میزبان نئوپلاسم‌های اولیه می‌باشد (۳).

۶-۱-۱ نئوپلاسم‌های روده بزرگ

بدخیمی‌های اپی‌تلیومی روده بزرگ از علل اصلی بیماری و مرگ و میر در دنیا هستند. کولون و رکتوم بیش از بخش‌های دیگر روده بزرگ، محل بروز سلول‌های سرطانی و انواع تومورهای پیش‌رونده می‌باشند. طبقه بندی تومورهای روده بزرگ عبارتند از:

۱- پولیپ‌های غیر نئوپلاسمی (خوش‌خیم) شامل: پولیپ‌های هیپرپلاستیک، پولیپ‌های هامارتومی، پولیپ‌های

التهابی، پولیپ‌های لنفاوی

۲- ضایعات اپی‌تلیالی نئوپلاسمی شامل: پولیپ‌های خوش‌خیم (آدنوم)، ضایعات بدخیم (آدنوکارسینوم،

کارسینوئید، کارسینوم کولورکتال، کارسینوم ناحیه مقعد)

۳- ضایعات مزانشیمی شامل: لیپوم، نوروم، آنژیوم، سارکوم کاپوسی

۴- لنفوم

▪ آدنوم ها

این تومورها، پولیپ های نئوپلاستیکی هستند که از تومورهای کوچک و اغلب پایه دار تا ضایعات بزرگ و معمولاً بدون پایه متغیرند. شیوع آدنوم های کولون قبل از ۴۰ سالگی حدود ۲۰-۳۰٪ است ولی بعد از سنین ۶۰ سالگی به ۴۰-۵۰٪ افزایش می یابد. هر ضایعه آدنوماتوزی از پرولیفراسیون و دیسپلازی اپی تلیال ناشی می شود که بیانگر تبدیل آدنوم به کارسینوم است و همچنین شواهد محکمی وجود دارد که بیانگر آن است که اکثر آدنوکارسینوم های مهاجم تک گیر کولورکتال از ضایعات آدنوماتوزی از پیش موجود، منشا می گیرند. (۳، ۴)

۱-۲ بخش دوم: کارسینوم کولورکتال

۱-۲-۱ اپیدمیولوژی

سرطان کولورکتال یکی از اصلی ترین دلایل مرگ و میر در سراسر دنیا محسوب می شود و از جمله شایع ترین بدخیمی های دستگاه گوارش می باشد که عامل اصلی بروز آن به طور دقیق شناخته نشده است. این سرطان چهارمین شایع در دنیا (۵) و از نظر مرگ و میر پس از سرطان ریه و پستان رتبه سوم را در میان زنان به خود اختصاص داده و در بین مردان پس از سرطان ریه و پروستات قرار می گیرد. با این وجود در مردان سرطان رکتوم و تا حدودی سرطان کولون نزولی و عرضی بیشتر از زنان مشاهده می شود. (۶) خطر ابتلا به این سرطان از ۴۰ سالگی شروع شده و با افزایش سن، شیوع آن نیز افزایش می یابد. (۷) در حدود ۹۸٪ سرطان های کولورکتال به صورت آدنوکارسینوم هستند و اغلب در پولیپ های آدنوماتوزی ایجاد می شوند که توسط خارج سازی قابل درمان هستند. (۸)

۱-۲-۲ اپیدمیولوژی سرطان کولورکتال در ایران

افزایش شیوع سرطان کولورکتال در میان جمعیت ایرانی ۶۰-۴۰ سال پیش بینی شده و با وجود عدم انجام بررسی های کافی در این خصوص، داده ها حاکی از روند رو به گسترش سرطان کولون در جمعیت جوان کشور می باشد که احتمالاً ناشی از تغییر عادات غذایی و گرایش ایرانیان و به خصوص نسل جوان به فست فودها و نیز استعمال دخانیات می باشد. (۹)

در مورد نوع و محل سرطان کولورکتال در ایران، آدنوکارسینوم شایع ترین نوع و رکتوم شایع ترین محل گزارش شده می باشند. بر اساس مطالعات انجام شده قبلی، میانگین سنی بیماران در ایران ۲۵ نسبت به میانگین سنی ذکر شده در منابع غربی پایین تر است. (۹)

نتایج حاصل از مطالعه ای انجام گرفته در ایران نشان داده است که میزان شیوع سرطان کولورکتال در زنان و مردان زیر ۴۵ سال تقریباً یکسان بوده ولی شیوع آن در مردان ۴۵ سال و بالاتر کمی بیش از زنان است. (۶) بنابراین با توجه به مطالب فوق بایستی با برنامه ریزی های بهداشتی و درمانی در خصوص اقدامات پیش گیرانه جهت کاهش عوامل خطرزای بیماری و آموزش وسیع جامعه و غربالگری مناسب و همچنین استفاده از پروتکل های درمانی در راستای کاهش شیوع ابتلا به سرطان کولورکتال و عوارض ناشی از آن در میان افراد کشور اقدامات اساسی انجام تا بدین ترتیب بار بیماری و عوارض ناشی از آن در سطح ملی کاهش یابد.

۱-۲-۳ اتیولوژی و ریسک فاکتورهای موثر در ابتلا به سرطان کولورکتال

۱-۳-۲-۱ فاکتورهای محیطی

▪ رژیم غذایی : محتوای پایین فیبر غیرقابل جذب مصرفی، مقادیر بالای کربوهیدرات های تصفیه شده در غذا، کاهش مصرف مواد محافظت کننده مانند ویتامین های A, B, C و افزایش مقادیر چربی در محتویات رژیم غذایی عوامل موثری در ابتلا به کارسینوم کولون محسوب می شوند. عوامل جهش زا مانند، آفلاتوکسین تولید

شده توسط کپک‌ها در پسته آلوده و یا نیتروزآمین ایجاد شده در غذاهای حاوی نیتريت مثل سوسیس، کالباس و مصرف زیاد گوشت قرمز خطر ابتلا به سرطان کولورکتال را افزایش می دهند.

همچنین روش‌های نادرست طبخ مانند دود دادن، نمک سود کردن و حرارت دادن شدید مواد غذایی با ایجاد ترکیبات سرطان زا مثل هیدروکربن‌های پلی سیکلیک و آمین‌های هتروسیکلیک باعث افزایش شیوع سرطان ها از جمله سرطان کولون می‌شوند، بنابراین می توان با کاهش مصرف غذاهای چرب و افزایش مصرف میوه و سبزیجات و استفاده از خاصیت آنتی اکسیدانی و محافظتی آن ها، شانس ابتلا به انواع سرطان ها نظیر معده، مری، مثانه، کولون، رکتوم و سرطان های حفره دهان را تا حد زیادی کاهش داد. (۱۰، ۱۱)

▪ مصرف سیگار: در مطالعات متعددی، ارتباط مثبت بین سیگار و سرطان رکتوم در مردان و ارتباط مثبت ضعیف بین سیگار و سرطان ابتدا کولون (پروگزیمال) و ارتباط معکوس با سرطان انتهای کولون (دیستال) ، بدون ارتباط با سرطان رکتوم نشان داده شده است. (۱۲)

▪ تحرک و ورزش: چاقی و بی تحرکی با افزایش خطر انواع سرطان ها به خصوص سرطان کولون همراه است و در تعدادی از مطالعات، ورزش منظم بیان گر کاهش خطر ایجاد سرطان سینه و کولون است.

▪ مصرف آسپرین: استفاده از برخی داروها نظیر آسپرین می تواند با مکانیسم احتمالی القاء آپوپتوز در سلول های توموری و مهار رگ زایی (آنژیوژنز) باعث حفاظت سلول ها در برابر انواع سرطان ها از جمله کارسینوم کولورکتال شود. در افرادی که به نحوی آسپرین و یا سایر داروهای ضد التهابی مصرف می کنند خطر ابتلا به سرطان کولون کاهش می یابد.

▪ مصرف الکل: مصرف الکل شانس ابتلا به سرطان کولون و رکتوم را بالا برده و مانع جذب فولات می

شود. (۱۳)

۱-۲-۳ عوامل وراثتی

تاریخچه فامیلی کلید اصلی تشخیص بوده و بهترین روش برای شناسایی افراد در معرض خطر سرطان

کولورکتال می باشد. بیماری های زمینه ساز برای ابتلا به سرطان کولورکتال عبارتند از:

▪ بیماری پولیپوز فامیلیال^۵:

این ناهنجاری به صورت ارثی به فرزندان منتقل می شود. ژن عامل آن APC^۶ می باشد. در این بیماری افراد دچار پولیپ‌های متعددی در سراسر کولون و گاهی سایر قسمت‌های دستگاه گوارش می‌شوند و افراد اغلب قبل از ۴۵ سالگی به سرطان کولون مبتلا می‌شوند.

▪ بیماری ارثی سرطان کولون بدون پولیپ (HNPCC)^۷:

این بیماری به صورت توارث غالب در افراد بروز می کند و شایع تر از نوع پولیپوز خانوادگی (فامیلیال) است و به دو شکل مشاهده می شود:

۱- در این شکل از بیماری ژن موسوم به MMR^۸ وجود دارد، از خصوصیات این بیماری وقوع سرطان در سن جوانی است و اغلب قسمت راست کولون را مبتلا می‌سازد.

۲- نوع دوم که به صورت سندرم فامیلی سرطان است و علاوه بر خصوصیات نوع اول سایر اعضای بدن از جمله رحم، تخمدان‌ها، معده و مجاری صفراوی هم دچار عارضه سرطان می‌شوند. (۱۴)

۴-۲-۱ مرحله بندی^۹ کارسینوم کولورکتال

به طور کلی سه سیستم برای مرحله بندی سرطان کولون ارائه شده است:

۱- سیستم دوک^{۱۰}

۲- سیستم استلر کولر

^۲ Familial Polyposis

^۳ Adenomatous Polyposis Coli

^۴ Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer

^۵ Mismatch repair gene

^۶ Staging

^۷ Duke

^۸ Tumor Node Metastasis system

۳- سیستم TNM^۸

- سیستم دوک: در سال ۱۹۳۷، دانشمندی به نام دوک سیستم مرحله بندی مشهور خود را برای کارسینوم رکتال پیشنهاد نمود .
- سیستم آستلر کولر: سیستم با وجود کاربردی بودن به علت تشابهاتی که با سیستم دوک داشت، بسیار گیج کننده بود.(۱۵)

- سیستم TNM: در این سیستم اجزاء متعدد به صورت گروهی، مورد استفاده قرار می گیرند.
- مرحله بندی کارسینوم کولون که توسط جاس مطرح گردید، الگوی رشد تومور، به عنوان معرف برجسته پیش آگهی بیماری، در نظر گرفته می شود. مرحله بندی TNM برای سرطان های کولون به صورت زیر است(۸) :
- ⇨ تومور(T)

صفر: بدون هیچ ضایعه

درجا (محدود به مخاط)

۱= تهاجم به زیر مخاط

۲= تهاجم به موسکولاریس پروپریا

۳= تهاجم به زیر سروز یا چربی غیر صفاقی اطراف کولون

۴= تهاجم به ارگان های مجاور

⇨ غدد لنفاوی (N)

صفر= بدون هیچ ضایعه

۱= ۱ تا ۳ غده لنفاوی اطراف کولون مثبت باشد.

۲= مساوی یا بیش از ۴ غده لنفاوی اطراف کولون مثبت باشد.

۳= هر تعداد غده لنفاوی در طول یک رگ خونی مثبت باشد.

↪ متاستاز به دور دست (M)

صفر= بدون هیچ ضایعه ای

۱= متاستاز دور دست

۱-۲-۵ درجه بندی^{۱۱} کارسینوم کولون

از لحاظ میکروسکوپی، کارسینومهای کولون به درجات I (کاملاً تمایز یافته)، II (با تمایز متوسط) و III (تمایز اندک) تقسیم می‌شوند. این تقسیم بندی با توجه به ارتباط آن با پیش آگهی ارزشمند است.

۱-۲-۶ علائم بالینی

آنمی فقر آهن، ضعف، خستگی، ناراحتی کرامپی و تغییرات اجابت مزاج (مثل اسهال و یبوست متناوب) از جمله علائم بالینی مهم در کارسینوم کولورکتال می باشند. وقتی که تومور در کولون چپ قرار می گیرد، انسداد روده ای شایع بوده و زمانی که در سکوم یا کولون صعودی واقع می شود، این انسداد نادر می باشد. کارسینوم سکوم ممکن است با علائم آپاندیسیت تظاهر یابد و ممکن است به ندرت روده سوراخ شود که علت آن اتساع ایجاد شده به علت انسداد ناشی از کارسینوم است. نمای اندوسکوپی، معمولاً اختصاصی است. اما بعضی از مناطق ملتهب، ممکن است نمای شبیه به کارسینوم داشته باشد. (۴)

محل های شایع متاستاز تومورهای کولورکتال به ترتیب شیوع عبارتند از :

غدد لنفاوی منطقه ای، کبد، ریه ها، استخوان ها و مناطقی مانند غشاء سروزی حفره پریتونال، مهم ترین شاخص منفرد در پیش آگهی کارسینوم کولورکتال، وسعت تومور در هنگام تشخیص است. (۸)

^{۱۱} Grading

۷-۲-۱ مورفولوژی

از نظر میکروسکوپی کلیه کارسینوم های کولورکتال شبیه یکدیگر هستند. آن ها اکثرا آدنوکارسینوم هایی هستند که ممکن است کاملاً تمایز یافته و یا آناپلاستیک و تمایز نیافته باشند. اکثر تومورها ترشحات موسینی ایجاد می کنند و به داخل دیواره های روده راه پیدا می کنند و انتشار تومور را تسهیل می نمایند، بنابراین این تومورها در مراحل پیشرفته تر به وجود می آیند و پیش آگهی بدتری دارند.

۸-۲-۱ پیش آگهی

تقریباً ۹۵٪ تومورهای بدخیم کولورکتال از نوع آدنوکارسینوم هستند و به نظر می رسد که اکثر سرطان های کولورکتال از نئوپلاسم های خوش خیمی برمی خیزند که آدنوم نام دارند. با افزایش اندازه آدنوم ها و پیشرفت آن ها به سمت دیسپلازی و سرطان کولورکتال، تعداد جهش ها افزایش یافته و شانس بقاء کاهش می یابد. (۱, ۱۶)

پیش آگهی کارسینوم کولون، به پارامترهای بالینی و پاتولوژیک زیر بستگی دارد:

- سن: تومورهایی که در سنین خیلی بالا یا پایین ایجاد می شوند، پیش آگهی بدی دارند.
- جنس: پیش آگهی بیماری در افراد مونث نسبت به افراد مذکر بهتر است.
- مقادیر سرمی CEA^{۱۲}: افزایش CEA سرم به بیش از ۵ ng/ml، اثرات بدی بر پیش آگهی بیماری دارد که مستقل از مرحله پیشرفت تومور است.
- موقعیت تومور: این فاکتور هنوز مورد اختلاف نظر است. تحقیقات نشان داده است که ضایعات کولون چپ، بهترین پیش آگهی را داشته در حالی که تومورهایی که در کولون سیگموئید و رکتوم قرار دارند، بدترین پیش آگهی را به خود اختصاص می دهند. همچنین ضایعات سمت چپ اغلب تمایل به عود دیررس دارند. (۱۷)

^۱Carcino Embryonic Antigen

▪ سایز تومور: اگر چه که بین سایز تومور و پیش آگهی آن رابطه وجود دارد ولی استثنا زیادی هم وجود دارد به طوری که نمی توان به آن به عنوان فاکتور پیش آگهی کننده قابل اعتمادی نگریست. همچنین، ارتباط اندکی نیز بین سایز تومور و شیوع متاستازهای غده ای وجود دارد. (۱۸)

▪ تهاجم عروقی: هنگامی که تهاجم به وریدها اتفاق می افتد، شانس بقای ۵ ساله، به میزان قابل توجهی کاسته می شود. اهمیت درگیری عروق لنفاوی، کمتر از اهمیت درگیری عروق خونی است اما زمانی که به صورت گسترده در بیماران مبتلا به مرحله III بیماری مشاهده شود، فاکتور پیش آگهی بدی محسوب می شود. (۸، ۱۹)

▪ انکوژن: جهش K-RAS در بعضی از کدون‌ها، در بیماران مبتلا به سرطان عود کننده کولورکتال شایع تر است. این وضعیت در مورد بیان بیش از حد پروتئین RAS و p21 نیز صادق است.

مطالعه در تومورهایی با جهش p53 نشان داد که این جهش خطر نسبی بیشتری برای عود بیماری نسبت به سایرین را ایجاد می کند به طوری که تا حدود زیادی منجر به مرگ بیمار می شود. (۲۰)

▪ درگیری غدد لنفاوی: با درگیری غدد لنفاوی بقای ۵ ساله بیمار، افت شدیدی پیدا می کند. طی یک مطالعه مشخص شد که اگر بیش از ۶ غده لنفاوی حاوی کارسینوم متاستاتیک باشند، کمتر از ۱۰٪ بیماران بیش از ۵ سال عمر خواهند کرد. اگر بیش از ۱۶ غده لنفاوی مزانتریک دچار کارسینوم باشند، تمامی بیماران ظرف ۵ سال فوت خواهند شد. (۲۱)

▪ مرحله بیماری: شانس بقاء در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال به مرحله بیماری وابسته است به طوری که بیماران با مراحل پیشرفته بیماری، پیش آگهی بدتری را نشان می دهند. (۲۲)

۱-۲-۹ ژنتیک مولکولی کارسینوم کولون

کشف انواع مختلفی از کارسینوم های فامیلیال کولون، منجر به کشف بعضی از تغییرات ژنتیکی مرتبط با این تومورها شده است. امروزه عقیده بر آنست که دو مسیر بیماریزایی مجزا در پیدایش سرطان کولون وجود دارد که در هر دو مسیر چندین جهش ژنتیکی باید اتفاق بیفتد تا این سرطان به وجود بیاید.

مسیر اول ⇨ مسیر APC/β- Catenin:

در این مسیر ناپایداری کروموزومی سبب تجمع یک سری از جهش‌ها بر روی انکوژن‌ها و ژن‌های سرکوبگر تومور می‌شود. بتا-کاتنین، با پروتئین APC در ارتباط بوده و بیان E کاده‌رین و آلفا-کاتنین در کارسینوم کولون، با تهاجم موضعی و متاستازهای آن، همراه است. این مسیر را توالی آدنوم- کارسینوم می‌نامند. تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در این مسیر عبارتند از :

- ۱- ناهنجاری در ژن سرکوبگر تومور APC: این مورد اولین رویداد در تشکیل آدنوم است. (۸)
- ناهنجاری در ژن APC به صورت حذف بازوی بلند کروموزوم شماره ۵ در سرطان کولون دیده می‌شود.
- ۲- موتاسیون K-RAS: ژن K-RAS در انتقال پیام داخل سلولی نقش داشته و در ۵۰٪ آدنوم‌های بالای یک سانتیمتر و ۵۰٪ کارسینوم‌ها، دچار موتاسیون می‌شود. یک مطالعه نشان داده که حذف کروموزوم ۵ و جهش نقطه‌ای در RAS در مراحل اولیه سرطان کولون و ناهنجاری در کروموزوم ۱۷ و ۱۸ در مراحل نهایی این سرطان اتفاق می‌افتد. (۲۳)
- همچنین بررسی ژن‌های موثر در سرطان کولون نشان داد که بسیاری از سرطان‌های کولون به علت اختلال در مسیر RAS-RAF-MEK-ERK بوجود می‌آیند که با عنوان میتوزن اکتیویتد پروتئین (MAP) نامیده می‌شود. از جمله ژن‌های دخیل در این مسیر می‌توان به ژن B-RAF اشاره کرد که در تعدادی کمی از سرطان‌های کولون دچار جهش می‌شود. (۲۴)
- در مطالعه دیگری با بررسی بیماران مبتلا به سرطان کولون، جهش در B-RAF و K-RAS نشان داده شد این جهش‌ها می‌تواند با الگوی متفاوت هایپرمتیلاسیون DNA در سرطان کولون و نقش این تغییرات در روند سرطان‌زایی در ارتباط باشند. (۲۵)

۳- حذف ۱۸q۲۱^{۱۳}: فقدان یک ژن سرکوبگر سرطان در ۱۸q۲۱ در ۶۰-۷۰٪ سرطان های کولون مشاهده

می شود. سه ژن در این ناحیه از کروموزوم وجود دارد که عبارتند از :

- DCC^{۱۴} که در کارسینوم کولون حذف می شود..

- DPC4/SMAD4 که در کارسینوم پانکراس حذف می شود.

- SMAD2

۴- فقدان TP53 ⇨ از دست رفتن TP53 در ۷۰-۸۰٪ کانسره های کولون گزارش شده است. با این حال فقدان

این ژن در آدنوم غیر شایع می باشد که نشان دهنده جهش در مراحل انتهایی کارسینوژنز کولون است. (۸)

مسیر دوم ⇨ ضایعات ژنتیکی در ژن های مسئول ناهماهنگ شدن DNA^{۱۵}:

در ۱۵-۱۰٪ موارد اسپورادیک، مسیر دوم اتفاق می افتد.

اولین رویداد در این مسیر، اختلال در ترمیم DNA ناشی از غیر فعال شدن ژن های DNA mismatch repair

می باشد. موتاسیون های ارثی در یکی از ۵ ژن DNA Mismatch Repair Genes موجب کارسینوم کولون

غیر پولیپتوزی ارثی (HNPCC) می شود و در پیش آگهی برای کانسره های منشا گرفته از پولیپ های

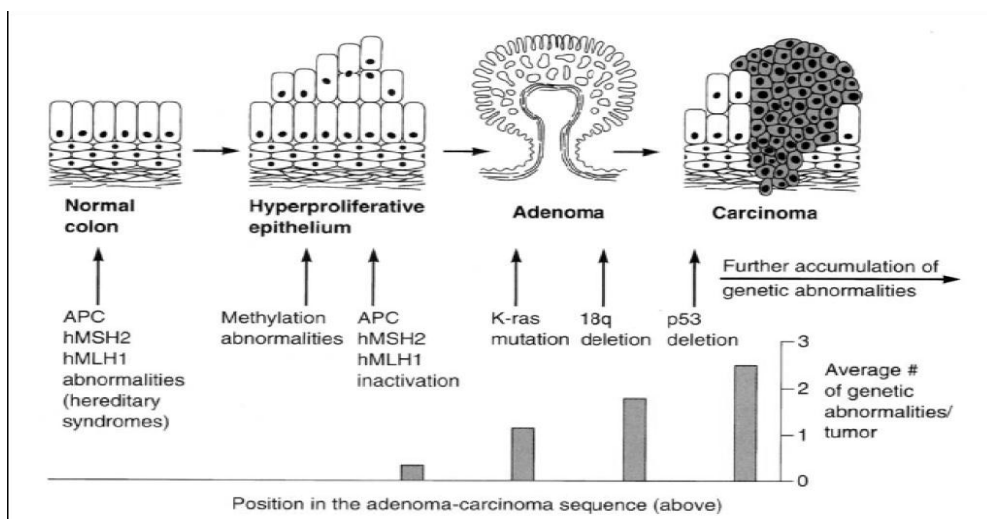
هیپرپلاستیک نقش دارد.

این پنج ژن عبارتند از :

PMS1، MLH1، MSH2، MSH6، PMS2 (۲۶)

^{۱۳} 18q21 Deletion

^{۱۴} Deleted in Colorectal Cancer



شکل ۱-۲: سیر تکاملی سرطان کولورکتال در مدل خطی توالی آدنوم-کارسینوم (۱۹)

بنابراین با توجه به شیوع نسبتاً بالای سرطان کولورکتال و افزایش روز افزون مبتلایان به این بیماری در سال‌های اخیر بررسی‌های متعددی در خصوص چگونگی دخالت زن‌ها در مسیر بروز این سرطان انجام گرفته است.

مطالعات بسیاری جهت شناخت تغییرات مولکولی مهم درون سلول برای کسب آگاهی از رفتار بیولوژیک تومورهای کولورکتال صورت پذیرفته است.

لذا شناسایی مسیرهای ژنتیکی و مارکرهای بیوشیمیایی موثر در بروز سرطان کولورکتال، توانسته است تاثیر به سزایی در تشخیص بیماری و پیشرفت اصول کلینیکی در مواجهه با بیماران داشته باشد.

۱-۳-۱ سیگنالینگ های سلولی دخیل در پاتوژنز سرطان کارسینوم کولورکتال

هرگونه اختلال در روند طبیعی سیگنالینگ های سلولی که تکثیر و رشد و بقا نرمال یک سلول را برهم بزند می تواند آغازگر روند تشکیل تومور (تومورژنیز) باشد.

تحقیقات امروزی بررسی فاکتورهای مختل کننده و یا مختل شده در سیگنالینگ های عمده را که در پاتوژنز ، پیشرفت و متاستاز سرطان نقش دارند را بیش از قبل مورد توجه قرار داده است.

ارتباط بین اجزای مسیرهای سیگنالینگ در چند نقطه با یکدیگر (Cross Talk) بیانگر اثرگذاری این مسیرها بر هم و گفتگو بین آن ها است، چند مرحله ای بودن سرطان نشانه وجود شبکه گسترده ای از اتفاقات در بروژیک بدخیمی است. (۲۷)

کارسینوژنیز کولون و رکتوم یک فرآیند چند مرحله ای از تکثیر پیش رونده سلول های اپی تلیال روده و تغییر تمایز و مکانیسم های بقای سلولی است.

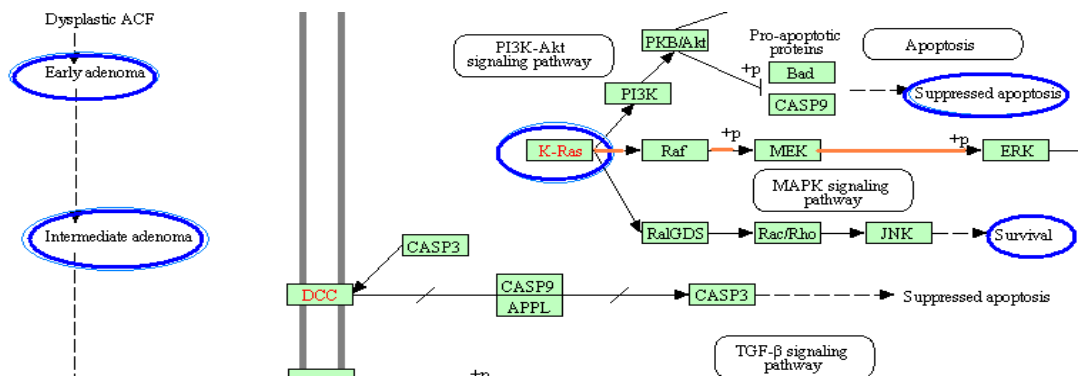
از سیگنالینگ های مهم در پاتوژنز سرطان می توان به سه مسیر:

1- MAPK signaling pathway _ میتوزن اکتیویتد سیگنالینگ

2- JAK-STAT signaling pathway جانوس کیناز

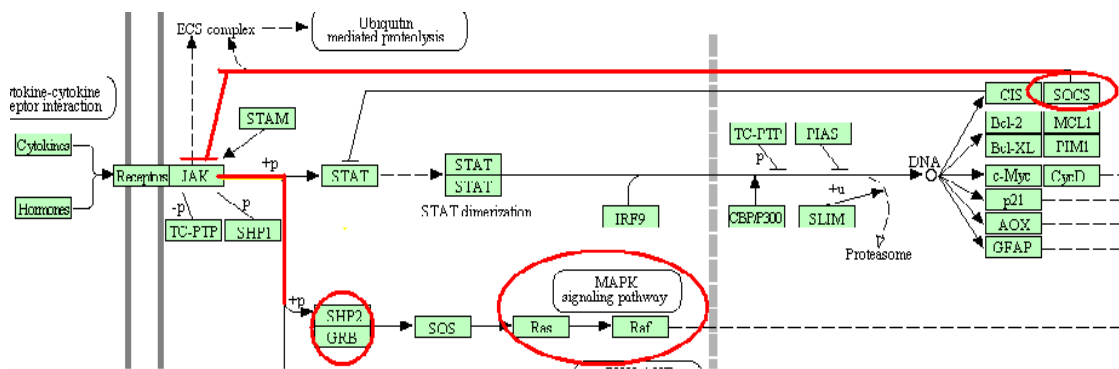
3- Angiogenesis آنژیوژنیز

که در بسیاری از سرطان های انسانی از جمله سرطان کولورکتال دخیل می باشند اشاره نمود. (۲۸)



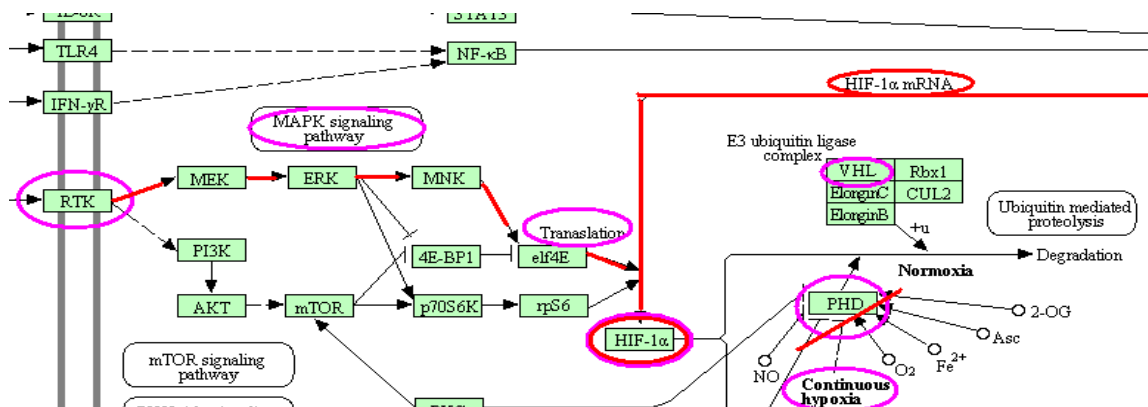
شکل ۳-۱: مسیر میتوز اکتیویتد سیگنالینگ MAPK در سرطان کولورکتال (۲۹)

JAK-STAT signaling pathway -2



شکل ۴-۱: مسیر سیگنالینگ JAK-STAT و مکان ارتباط با مسیر MAPK (29)

Angiogenesis -3



شکل ۵-۱: مسیر سیگنالینگ هیپوکسی و مکان ارتباط با مسیر MAPK (29)

۱-۳-۲ سیگنالینگ میتوزن اکتیویتد پروتئین کیناز MAPK signaling pathway

مسیر MAPK-ERK (Mitogen-activated protein kinases) مسیر کینازی محافظت شده در پستانداران است که به واسطه سیگنال های خارج سلولی پروسه های اساسی سلولی مانند رشد ، تکثیر ، تمایز ، مهاجرت و آپوپتوز سلولی را کنترل می کند .

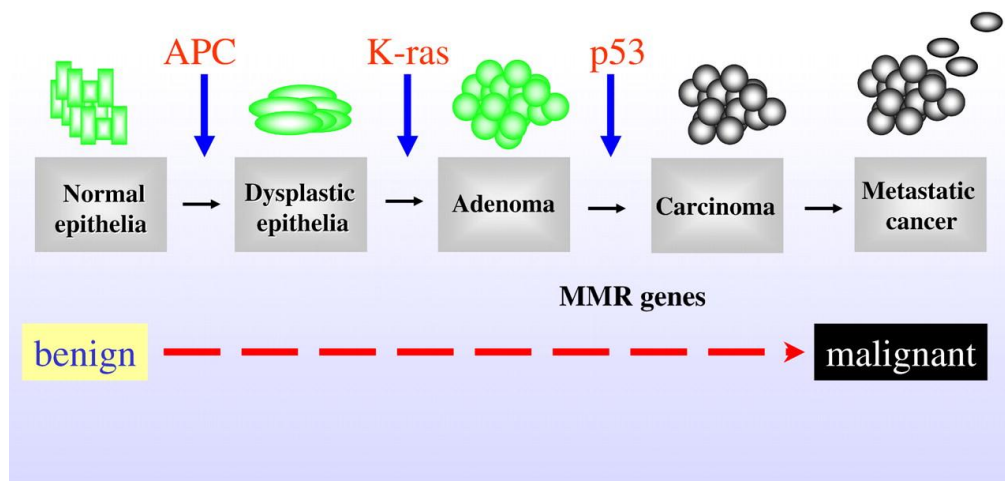
مسیر ERK بیشترین مسیر مورد مطالعه در پستانداران است که تقریباً در ۱/۳ از تمام سرطان های انسانی نقص آن مشاهده و نقش آن در ایجاد فنوتایپ توموری واضح و معین شده است.

اکثر نقایص مرتبط با ایجاد سرطان به علت فعالیت پایدار مراحل ابتدایی این مسیر و ناشی از عللی مانند افزایش بیان رسپتور تیروزین کینازی فعال شدن موتاسیون های مرتبط با رسپتور تیروزین کیناز ، اثرات اتوکراین و پاراکراین لیگاند های فعال کننده و موتاسیون های ژن KARS و BRAF می باشد .

فرکانس بالای موتاسیون در محور RAS-RAF پیشنهاد کننده نقش این محور به عنوان نقطه داغ تنظیمی است.

پروتئین RAS-GTPase به عنوان سوئیچ کنترل بسیاری از مسیرها می باشد و موتاسیون KRAS در انواع سرطان ها شیوع بالایی دارد. انواع موتاسیون ها در کدون های ۱۲، ۱۳ و ۶۱ مانع از هیدرولیز GTP و باعث فعالیت دائم RAS می شود که به دنبال آن باعث فعال شدن عوامل پایین دست خود از جمله RAF می گردد.

تشکیلات خاص و جایگیری انکوژن RAS نشاندهنده نقش بسیار مهم و اساسی آن در تنظیم سیگنالینگ های پایین دست و مرتبط با پروسه های سلولی دخیل در تومورزایی است. (۳۰، ۳۱)



شکل 1-6: تغییرات گوناگون ژنتیکی در مراحل مختلف ایجاد بدخیمی (۳۲)

۱-۳-۳ نقش همولوگ انکوژن ویروس سارکومای رات کرسستین

KRAS: V-Ki-RAS2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

این نوکلئوپروتئین ۱۸۸ آمینو اسیدی و خطی محصول پروتئینی ژن KRAS نرمال (wild) است.

این ژن در سیگنالینگ سلول های بافت نرمال نقش اساسی را ایفا می کند. موتاسیون در این ژن مرحله ضروری

در ایجاد بسیاری از سرطان ها می باشد مانند دیگر اعضای خانواده RAS پروتئین KRAS یک GTPase و

بازیگر مهم و اولیه در بسیاری از مسیرهای سیگنالینگ می باشد. این پروتئین از ناحیه ایزوپرنیل در ناحیه C-

Terminus به غشای سلولی متصل است و به عنوان کلید روشن و خاموش سیگنالینگ سلولی عمل می کند.

در حالت روشن باعث فراخوانی پروتئین های لازم برای فعالیت سیگنال رسپتور مثلا PI3K می شود. (۳۳)

۱-۳-۴ مراحل انتقال پیام رشد توسط EGFR در MAPK signaling pathway

الف) اتصال EGF و دایمریزاسیون EGFR

فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) پلی پپتیدی با وزن ۶ کیلودالتون است که موجب تحریک رشد سلول های

اپیدرمی و اپیتلیال می گردد. اولین مرحله در مسیر انتقال پیام، اتصال EGF به گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی

(EGFR) است.

این گیرنده در غیاب لیگاند از نظر آنزیمی غیرفعال است. با اتصال لیگاند (EGF) به EGFR، زیر واحدهای مونومری این گیرنده دایمریزه و فعال می شوند.

ب) دایمریزاسیون EGFR و اتوفسفریلاسیون تیروزین کینازی

دایمریزاسیون زیر واحدهای EGFR منجر به اتوفسفریلاسیون واحدهای ویژه تیروزین کیناز در قسمت سیتوپلاسمی گیرنده می شود .

پنج واحد تیروزینی در این ناحیه فسفریله می شوند. دایمریزاسیون EGFR باعث می شود که ناحیه C-انتهایی یک گیرنده به داخل جایگاه فعال کیناز مجاور آورده شود . کیناز به تنهایی در یک ساختار فعال بدون فسفریلاسیون قرار دارد و این نکته را روشن می سازد که چگونه این سیستم پیام رسانی مجدداً برای پاسخ دهی به حالت تعادل و موازنه در می آید.

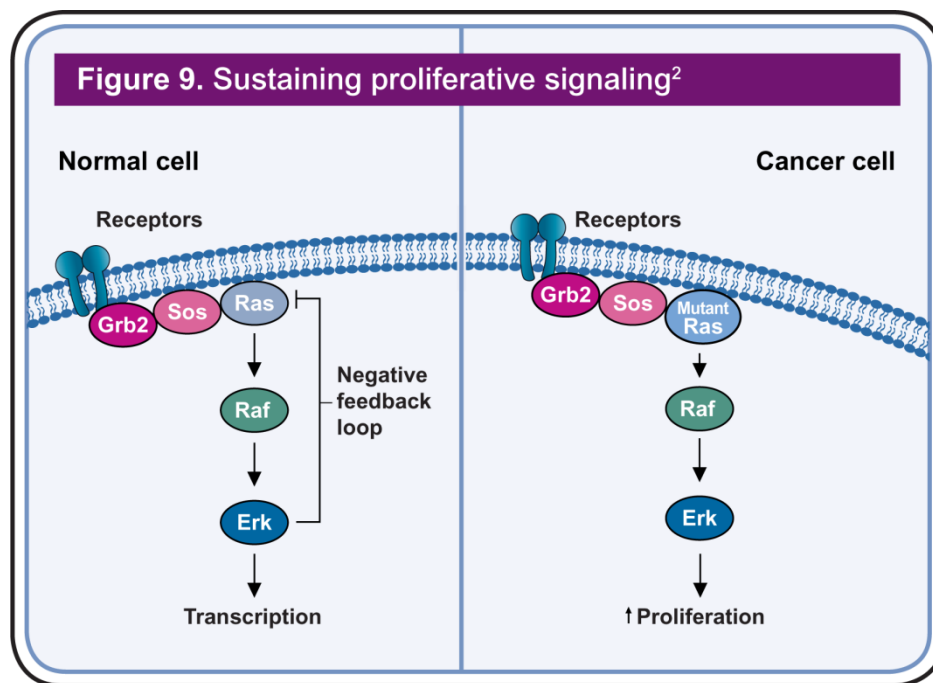
ج) فعال سازی مولکول RAS توسط G پروتئین

تیروزین کینازهای فسفریله و فعال شده به عنوان جایگاه های باراندازی برای دومین های SH2 دیگر پروتئین ها عمل می کنند. بنابراین پروتئین Grb2 از طریق دومین SH2 خود به واحدهای فسفوتیروزینی در تیروزین کینازها متصل شده و بدین ترتیب زنجیره واکنش ها با اتصال یک پروتئین کلیدی تنظیمی به نام Grb-2 آغاز می گردد.

سپس Grb2 به فاکتور تبادل نوکلئوتید گوانین به نام SOS متصل می شود. SOS به نوبه خود، بخش پیوند شونده نوکلئوتیدی پروتئینی به نام RAS را آزاد کرده و GDP متصل به آن را با GTP تعویض می کند و بدین ترتیب سبب فعال شدن RAS می گردد که عضوی از رده پروتئین ها به نام پروتئین های G است و بخش مهمی از مسیر انتقال پیام محسوب می شود.

ه) RAS فعال آغاز کننده مسیر آبخاری پروتئین کینازی MAPK

فاکتور RAS فعال شده به شکل GTP دار به پروتئین های دیگری از جمله پروتئین کیناز RAF متصل می شود. فاکتور RAF نیز از طریق یک پیوند کووالانسی لیپید ایزوپرن به غشاء متصل شده و گروهی از پروتئین کینازهای فعال کننده میتوژن (MAPKs) شامل MEK و ERK را فعال می کند. کیناز ERK پاسخگو به سیگنال های خارج سلولی است که پس از فعال شدن به هسته رفته و تعدادی از فاکتور های رونویسی را فعال می کند که نتیجه آن ها پاسخ سلول به تکثیر، تهاجم و تمایز است. (۳۴، ۳۵)

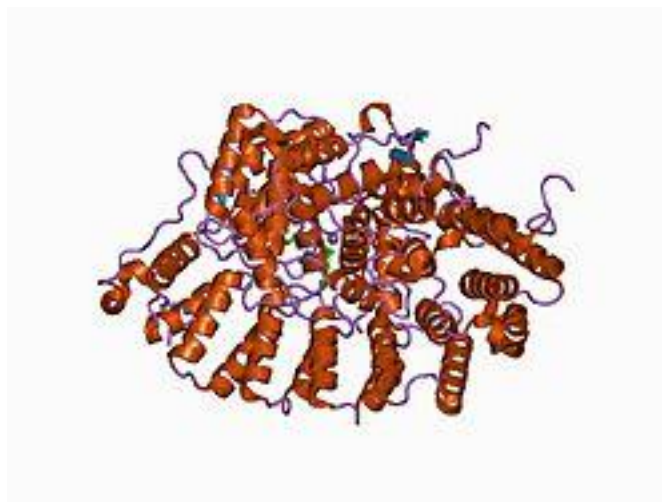


شکل ۱-۷: مکانیسم اثر RAS موتانت در تکثیر سلول سرطانی (۳۶)

۱-۳-۵ نقص در مسیرهای انتقال پیام به سرطان می انجامد

به دلیل پیچیدگی این مسیرها، نقص در مسیرهای انتقال پیام، می تواند به حالات بیماری یا پاتولوژیک منتهی شود. سرطان، به وسیله رشد غیر قابل کنترل و نامناسب سلول ها مشخص می گردد که با نقص پروتئین های

موثر در مسیرانتقال پیام ارتباط زیادی دارد. از جمله مهم ترین این پروتئین ها KRAS است که با اتصال به GTP و ایجاد فعالیت آنزیماتیک GTP را به GDP تبدیل و خودش غیر فعال می گردد. پرتوانکوژن (Kirsten RAS oncogen homolog) از جایگزینی یک آمینو اسید و جایگزینی یک نوکلئوتید خاص ایجاد و به حالت موتانت مبدل می شود.



Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

شکل ۱-۸: ساختار همولوگ انکوژن ویروس سارکومای رات کرسستین KRAS (37)

۱-۳-۶ نقش KRAS در سرطان کولورکتال

فعال شدن KRAS مطابق مسیر انتقال پیام شرح داده شده باعث راه اندازی سیگنال داخل سلولی می شود که در نهایت به پاسخ سلول به فرآیندهای تکثیر، تمایز، متاستاز و آپوپتوز منجر می شود. در سلول طبیعی برآیند تکثیر و آپوپتوز به گونه ای است که موجب فرآیندهای طبیعی و بدون بیماریزایی در بافت موجود زنده می شود. (۳۸)

با این وجود فعالیت غیر طبیعی در پروتئین KRAS و از بین رفتن مکانیسم های تنظیم کنندگی آن، منجر به افزایش تکثیر در سلول و فعال کردن سایر پیش برنده های تومور می گردد. (۳۹)

فعالیت غیرطبیعی پروتئین KRAS که در اثر افزایش بیان این پروتئین بوجود می آید با پیشرفت سلول های توموری و افزایش بدخیمی در آن ها همراه است .

۱-۳-۷ جهش^{۱۶}، تقویت ژنی^{۱۷} و تعداد نسخه های ژن KRAS^{۱۸}

جهش نقطه ای در کدون های ۱۲ و ۱۳ واقع در اگزون شماره ۲ و جهش در کدون ۶۱ واقع در اگزون ژن کدکننده KRAS در تومورهای کولون شایع است.

همچنین نتایج برخی از مطالعات نشان داده است که تقویت این ژن نیز در سرطان کولورکتال اتفاق می افتد.

این تغییر پروتئینی باعث طیف زیادی از بدخیمی مانند، آدنوکارسینوم ریه، داکتال کارسینوم پانکراس و کارسینوم روده بزرگ می شود. موتاسیون جرم لاین این ژن با سندرم نونان و کاردیوفاشیو کوتانئوس سندرم ارتباط دارد. موتاسیون های سوماتیک این ژن با میزان بسیار بالایی در لوکمی، کانسر روده، کانسر پانکراس و کانسر ریه وجود دارد. موتاسیون اولیه K-RAS باعث ضایعات خود و محدود شونده هیپرپلاستیک می شود اما چنانچه موتاسیون بعد یک APC موتاسیون قبلی رخ دهد اغلب موجب سرطان خواهد شد.

شایع ترین تغییرات نوکلئوتیدی در دومین نوکلئوتید کدون ۱۲ و شایعترین موتاسیون آن جایگزینی آسپارتیک اسید با گلیسین می باشد. (۴۰)

شناخت مسیرهای انتقال پیام مرتبط با سرطان، موجب پیدایش نگرش های جدید درمانی در خصوص مهار گیرنده های خانواده EGFR شده است. این پروتئین ها از مهم ترین اهداف درمانی در بسیاری از سرطان ها از جمله سرطان کولون، ریه و پانکراس می باشند.

در حال حاضر ترکیبات مهار کننده خانواده EGFR به دو صورت آنتی بادی های مونوکلونال (Mabs) و مهار کننده های تیروزین کینازی وجود دارند.

▪ آنتی بادی های مونوکلونال ⇨ این آنتی بادی ها بر علیه دومین خارج سلولی رسپتور های ERBB عمل می کنند و شامل آنتی بادی های زیر می باشند:

۱- آنتی بادی های مهار کننده رسپتور های وابسته به لیگاند (Anti-EGFR) ⇨

^{۱۶} Mutation

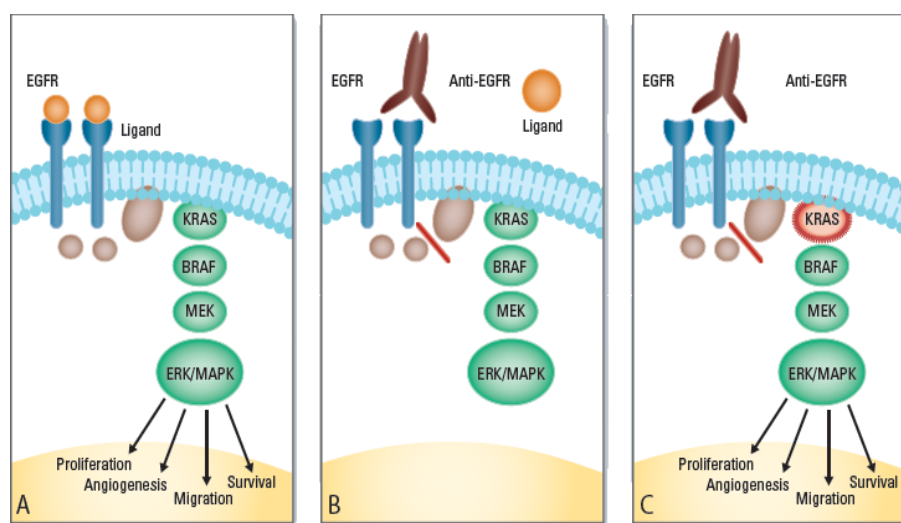
^{۱۷} Amplification

^{۱۸} Gene Copy Number

این نوع آنتی بادی ها نقش کلینیکی مهمی در درمان بسیاری از تومور های بدخیم شامل سرطان های کولون، نئوپلاسم های سر و گردن و کارسینوم های ریه ایفا می کنند.

برای نخستین بار در سرطان کولون، فعالیت ضد توموری این نوع از آنتی بادی ها با مصرف داروی Cetuximab مشاهده شد. این آنتی بادی با EGF بر سر اتصال به گیرنده آن رقابت می کند و بدین ترتیب باعث توقف فسفوریلاسیون و عدم فعالیت EGFR و مهار سیگنال داخل سلولی شده و از تکثیر بی رویه سلول های سرطانی جلوگیری می نماید.

۲-آنتی بادی های مهارکننده رسپتورهای غیر وابسته به لیگاند (Anti-HER2) ⇐ این دسته از آنتی بادی ها با اتصال به گیرنده HER2 از فعالیت این پروتئین جلوگیری کرده و مانع از انتقال پیام به داخل سلول می شوند.



شکل ۱-۹: شکست مهار کننده های ضد EGFR در درمان سرطان کولون KRAS موتانت (۴۱)

مهارکننده های تیروزین کینازی: این دسته از ترکیبات با آدنوزین تری فسفات (ATP) برای اتصال به دومین گیرنده رقابت می کنند و با مهار فعالیت تیروزین کینازی در گیرنده مانع از برقراری سیگنال داخل سلولی ناشی از فعالیت آن می شوند. یکی از انواع این مهارکننده ها که به EGFR متصل می شود و در درمان سرطان کولون نقش مهمی را ایفا می نماید است. (۴۲)

موتاسیون K-RAS موجب پیش آگهی خیلی ضعیف در پاسخ به درمان به Panitumumab و Cetuximab می گردد و درمانی به وسیله (Anti-EGFR) مثل cetuximab منتفی خواهد شد. شکل ۱-۹ به طور شماتیک نحوه عدم مهار سیگنالینگ را در موارد موتانت نشان می دهد. (۴۳، ۴۴)

امروزه حقیقی ترین روش ارزیابی پاسخ به درمان توسط مونوکلونال آنتی بادی ها یا داروهای مهارکننده EGFR تست بررسی موتاسیون K-RAS است که تقریباً در ۳۰-۵۰٪ سرطان های کولورکتال وجود دارد.

K-RAS به عنوان یک مارکریولوژیک پیش گویی و پیش بینی کننده مهم در روند سیر بیماری و پاسخ به درمان در کانسر کولون می باشد. (۴۵)

۱-۴-۱ سیگنالینگ جانوس کیناز (JAK-STAT) و هدایت سیگنال و فعال کننده نسخه برداری

مسیر JAK-STAT یک سیگنالینگ حفاظت شده در پستانداران است و این امر حاکی از ضرورت وجود آن در یک سلول نرمال می باشد. مسیر JAK/STAT3 از طریق رسپتور غشایی و به وسیله عوامل مختلفی مانند سیتوکین ها و با اتوفسفوریلاسیون JAK و در پی آن فسفوریلاسیون STAT3 فعال می گردد .

شواهد نشان می دهد آنومالی های JAK/STAT3 نقش مهمی در نقص عملکرد ایمنی ، رشد ، تمایز و بروز انکوژنیزیس دارد . سیگنالینگ JAK-STAT3 در کولورکتال کانسر مشابه با بسیاری از تومورهای بدخیم افزایش تکثیر و فنوتایپ مهاجم در سلول های کانسر کولون با آنومالی در انتقال سیگنال سلولی ارتباط دارد. (۴۶)

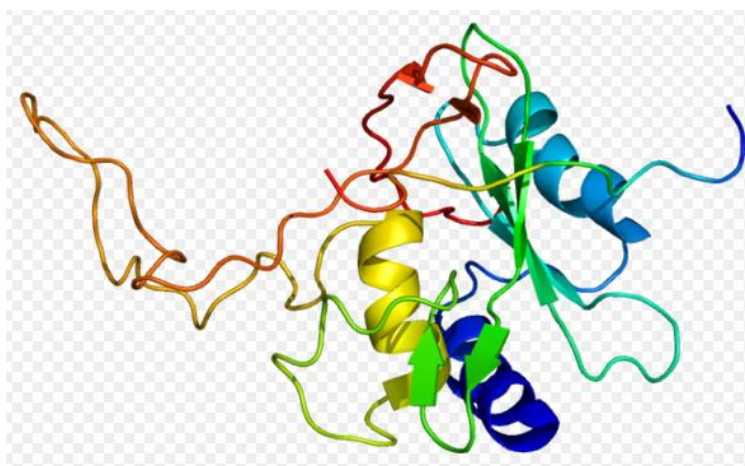
مسیر سیتوکینی سیگنالینگ IL-6/JAK/STAT3 نقش اساسی در بروز کانسر کولون دارد، به طور معمول مکانیسم مولکولی ایجاد سرطان روده با بیان پروتئوکوزن های (RAS, Src) و ژن های مهار کننده تومور مختلف ، سیتوکین ها و رسپتورهای سیتوکینی و فاکتور رشد اپیدرمی ارتباط دارد. (۴۷)

۱-۴-۲ تنظیم سیگنالینگ JAK-STAT3

با توجه به اینکه بیان نابجای این مسیر در بروز سرطان کولون نقش مهمی دارد، بنابراین تنظیم گرهای این مسیر ارزش بالایی در مهار سرطان خواهند داشت . شکل ۱-۱۰ ساختار دومین پروتئین SOCS3 را نشان می دهد.

پروتئین های (3 suppressor of cytokine signaling)" شامل ۸ اعضای فامیلی از (۱-۷) اعضای دیگری به نام CIS هستند.

این ژن اعضای مهارکننده های STAT القا شونده توسط STAT (SSI) را کد می کند. (SSI) یا همان (SOCS1-3) که اعضای این گروه از مهارکننده های منفی القا کننده سیتوکین در سیگنالینگ سیتوکین می باشد.



شکل ۱-۱۰: ساختار دومین های پروتئین SOCS3

۱-۴-۳ سیگنالینگ JAK-STAT در کانسر کولون

در مسیر JAK-STAT3 اعضای SOCS1,3 از تنظیم گره های منفی (مهارکننده) هستند که با روی فعال شدن این مسیر از طریق اینترلوکین ۶ (IL-6) بیشترین اثر مهاری را نشان میدهد. مولکول SOCS3 در انواع کانسره های مرتبط با التهاب و همچنین سل لاین های سرطان کاهش بیان دارد که این کاهش با افزایش STAT3 در این سلول ها ارتباط قوی را نشان می دهد. پروتئین SOCS3 با اتصال به JAK2 کیناز باعث مهار آن می شود همچنین عوامل دیگری مانند DNA متیلاسیون، ناشی تغییرات اپی ژنتیکی در کاهش بیان SOCS3 در کانسر کولون نقش دارد. (۴۸)

مطالعات نشان داده، عدم یا کاهش بیان SOCS3 در سرطان هایی مثل تومور پستان، کبد و ریه موجب تسهیل در تشکیل تومور می شود که این امر نشاندهنده نقش تومور سرکوبگر این ژن می باشد.

هایپرمتیلاسیون پروموتور و کاهش بیان SOCS3 در اولسراتیوکولیتیس مرتبط با کانسر کولون نیز گزارش شده است. (۴۷)

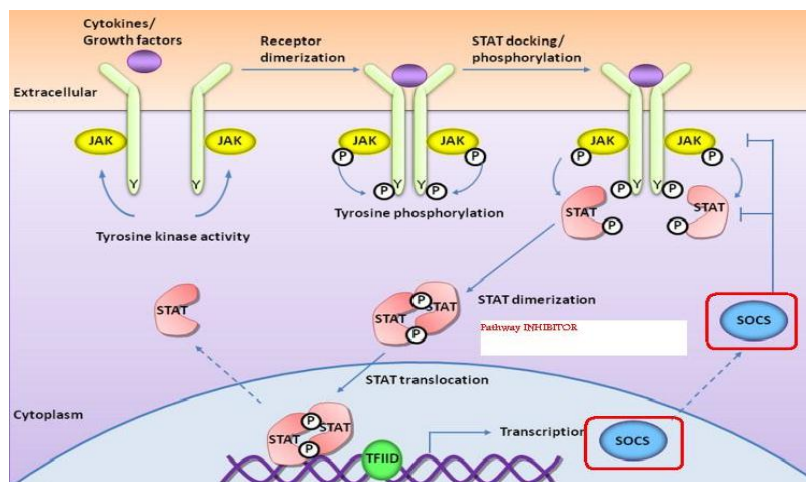
از طرفی دیگر رژیم های مشتق از پلی فنل در مهار رگ زایی (آنژیوژنز) به وسیله تنظیم بیان رسپتور IL-6R α و پروتئین SOCS3 باعث مهار کانسر کولون می شود. (۴۹) شکل ۱-۱۱ اجزای مسیر JAK-STAT و نحوه فعال شدن و مهار شدن مسیر JAK-STAT را نشان می دهد.

فاکتور STAT3 با فراخوانی آداپتور پروتئین Grb2 مولکول RAS را فعال می کند و در نهایت کل مسیر میتوزن اکتیویتد پروتئین کیناز (MAPK pathway) که یکی از شناخته شده ترین مسیرهای مرتبط با سیگنالینگ JAK-STAT3 است را راه اندازی می کند.

فعالیت دائم آبخار RAS دربروز بسیاری از سرطان های انسانی، خصوصا سرطان کولون وجود دارد. MAPK با فعال سازی STAT، نسخه برداری از ژن SOCS3 را تقویت می کند و مولکول SOCS3 با مهار RAS/GAP باعث مهار MAPK pathway می شود. (۴۷)

شواهد نقش اساسی مسیر IL-6/JAK/STAT3 در ایجاد بدخیمی کولون و رکتوم را تایید می کند و استفاده از مهار کننده ها می تواند اطلاعات مهمی جهت فهم بهتر مکانیسم مولکولی و بیماریزایی آن و ایجاد روش های جدید درمانی ایجاد کند. (50)

با توجه به اینکه رگ زایی یا آنژیوژنیزیس تومور موجب رشد، بقا و متاستاز تومور می شود نقش این دو سیگنالینگ JAK-STAT، MAPK pathway در افزایش ریسک تهاجم عروقی در محیط هیپوکسیک تومور اهمیت پیدا می کند. (۹)



شکل ۱-۱۱) اجزای مسیر JAK-STAT و نحوه فعال شدن و مهار شدن مسیر (۵۱)

۱-۵-۱ تعریف نورموکسی و هیپوکسی

سطح نیاز به اکسیژن در بافت های مختلف و در نواحی متفاوت و حتی در ارگان های مختلف برحسب عملکرد آن متغیر است . تامین اکسیژن برای سلول و بافت متناسب با تقاضا معین می شود مقدار بهینه آن برای هر سلول نورموکسی نام دارد.

هیپوکسی هنگامی رخ می دهد که تقاضا برای استفاده از اکسیژن در سلول افزایش می یابد و این افزایش تقاضا بیشتر از منبع اکسیژنی در دسترس سلول است . به عبارت دیگر ، منبع اکسیژن از میزان تقاضا کمتر است. سلول بدون منبع کافی اکسیژن سلول قادر به تولید انرژی لازم برای اعمال حیاتی و پروسه های ضروری نخواهد بود و هیپوکسی باعث مرگ سلول خواهد شد.

۱-۵-۲ علل فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی هیپوکسی

هیپوکسی می تواند ناشی از علل فیزیولوژیکی (ورزش طولانی) یا علل پاتوفیزیولوژیکی مانند بیماری یا آسیب ایسکمیک در سلول رخ دهد. هیپوکسی در طی تکامل و به عنوان یک نشانه حیاتی موجب پروسه رگ زایی و تکثیر سلول می شود .

بیماریهای نئوپلاستیک که با تکثیر سریع سلولی و غیر متناسب با رشد عروق می باشد باعث هیپوکسی موضعی در تومورهای جامد می گردد. همچنین هیپوکسی می تواند به عنوان یک فاکتور مهار کننده رشد تومور و تغییرات سازشی برای ادامه رشد عمل کند.

۱-۵-۳ فاکتورهای محرک هیپوکسی

تمام سلول های هسته دار بدن قادر به حس کاهش اکسیژن و برقراری تعادل (هموستاز) و تغییرات سازشی در مقابل هیپوکسی هستند. در روند پاسخ های سازشی سلول در مقابل هیپوکسی، تعداد زیاد ژن های تنظیمی دخیل هستند. این پاسخ غالبا ژنومیک بوده و به طور برجسته باافزایش فاکتورهای تحریک کننده هیپوکسی (HIFs)، فاکتورهای نسخه برداری از ژن های بیان شونده در پاسخ به هیپوکسی واسطه گری می شود. دو زیر واحد هتروداایمری HIFs از اعضای هلیکس لوپ هلیکس و همسان با فاکتورهای نسخه برداری و برای اتصال به DNA و دایمریزاسیون اهمیت دارند. زیر واحد بتا فاکتور HIF ناقل رسپتور آریل هیدروکربن است و به صورت پایدار در پروتئین هسته بیان می شود در حالیکه زیرواحد آلفا وابسته به اکسیژن بیان می گردد. این دو زیر واحد در حالت عملکردی، مجموعه نسخه برداری را تشکیل می دهند و موجب تغییر بیان ژن های تنظیم اکسیژن سلولی هستند.

در زمان هیپوکسی HIF با دریافت سیگنال به شکل پایدار وفعال خود به هسته منتقل می شود و با زیر واحد بتا به صورت دایمر در آمده و به عناصر پاسخ دهنده به هیپوکسی بر روی DNA (HRE) متصل می گردد. در ادامه کمک فعالگرهای (کواکتیور) دیگری به محل فراخوانی می شوند و با اتصال به نواحی ترانس اکتیواتور شکل ابتدایی از کمپلکس آغازین را ایجاد می کنند.

به نظر می رسد دومین ترانس اکتیواتور در دو ناحیه C-Terminal و N-Terminal مولکول HIF با اتصال دو مونو دایمر بتا و ایجاد هتروداایمر کامل فعال می شود.

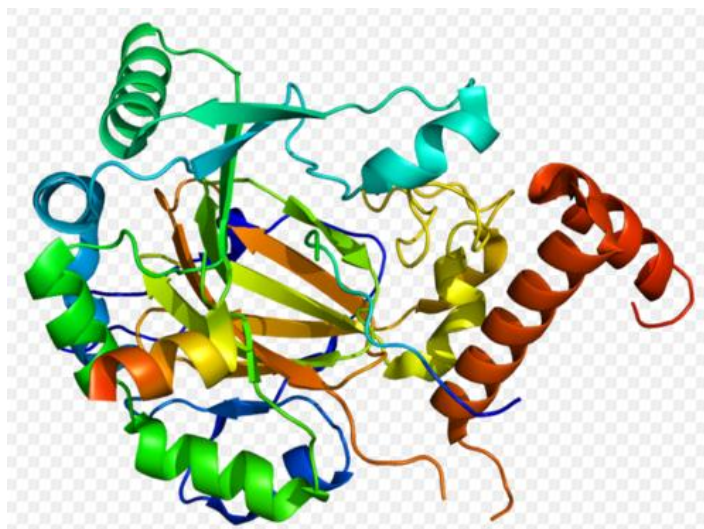
نواحی C-Terminal، یک دومین اصلی در تنظیم نسخه برداری از بسیاری از ژن های هدف HIF است.(۵۲)

۴-۵-۱ ژن های هدف فاکتور القا کننده هیپوکسی (HIFs) Hypoxia-inducible factors

ژن های هدف HIF در پروسه های مختلف سلولی مانند آنژیوژنیز ، وازودیلاسیون ، اریتروپوئیز ، متابولیسم و آپوپتوز سلولی نقش دارند . فاکتورهای پروآنژیوژنیک و فاکتور رشد اپیدرم عروق (VEGF) و بیش از ۷۰ ژن دیگر از جمله اریتروپوئین (EPO) با تحریک رشد اندوتلیال عروقی موجب تشکیل عروق و رگ زایی در نواحی هیپوکسیک می شود.

۵-۵-۱ "فاکتور مهار کننده HIF1" : FIH-1 or Factor inhibiting HIF-1 (FIH-1)

HIF1AN یا به عبارت ساده تر FIH1 یک پروتئین "حفاظت شده" در موش و انسان و رات می باشد . نقش این مولکول در تمایز جنینی قلب ، نشان دهنده نقش بنیادی و فیزیولوژیک آن است. این فاکتور که نوعی "آسپارژیل هیدروکسیلاز مهار کننده HIF1" می باشد به طور ویژه در ارتباط با کمک به مهار رگ زایی (آنژیوژنز) ، عدم پیشرفت و متاستاز بیماری های نئوپلاستیک اهمیت دارد ، شکل ۱-۱۲: ساختار دومین های پروتئین FIH1 را نشان می دهد.



شکل ۱-۱۲: ساختار دومین های پروتئین FIH1

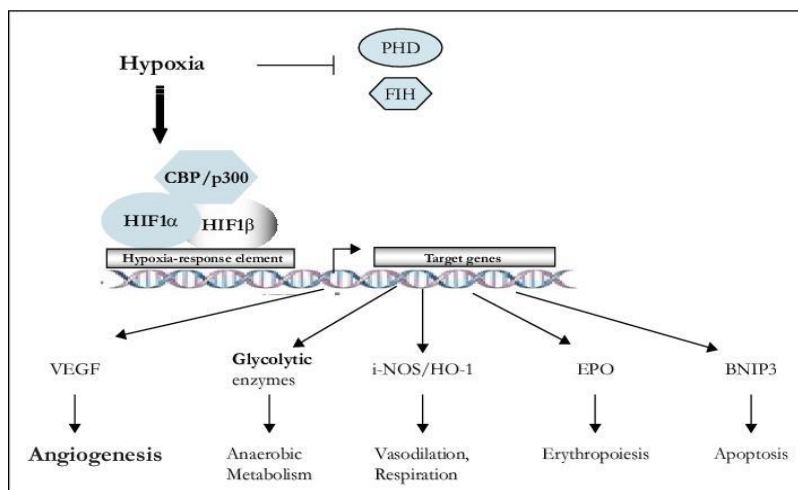
۱-۵-۶ نقش آسپاراژیل و پرولیل هیدروکسیلازها در ناپایداری HIF

بیان HIF در سلول ها ثابت و پایدار است، و در شرایط نورموکسی به سرعت تخریب می شود. این تخریب فیزیولوژیک به واسطه هیدروکسیلاسیون پرولیل (prolyl hydroxylase) در دومین مرکزی و وابسته به اکسیژن توسط آسپاراژیل و پرولیل هیدروکسیلاز ها رخ می دهد (HPHs) Hydroxy prpyl hydroxylase. آسپاراژیل هیدروکسیلازها با مکانیسم یوبی کوئیتینیشن، در پروتئوزوم سلول موجب تخریب HIFs می شوند. تومور ساپرسور ون هیپل لندائو (VHL) با شناسایی اجزای لیگاز یوبی کوئیتین می تواند با اتصال به هیدروکسی پرولین وهیدروکسی آسپاراژیل باعث تسهیل پلی یوبی کوئیتینیشن و تخریب آن گردد. از آنجا که هیدروکسیلازها برای فعالیت خود به اکسیژن نیاز دارند کاهش اکسیژن با کاهش فعالیت آن ها ارتباط دارد و این زمان HIF از تخریب گریخته و به هسته مهاجرت می کند و با اتصال به زیرواحد بتا کمپلکس را فعال و نسخه برداری را شروع می نماید.

ملکول های سوپراکسید واکنش گر (ROS) درون میتوکندری با تغییر فعالیت این هیدروکسیلازها موجب پایداری HIF درون هسته می گردند. در شرایط نورموکسی اتصال کمپلکس CBP/P300 (کواکتیواتورهای نسخه برداری) با دومین فعال سازی c-Terminal (CAD)، هیدروکسیله و مهار می شود.

این هیدروکسیلاسیون به واسطه فاکتور "آسپاراژیل هیدروکسیلاز مهار کننده HIF1" یا "فاکتور مهارکننده HIF1" Factor Inhibiting HIF1 (FIH-1) یا به عبارتی FIH-1 صورت می گیرد. شکل ۱-۱۳: نقش FIH1 و دیگر مهار کننده های HIF در شرایط هیپوکسی را نشان می دهد. (۵۳)

FIH-1 به دلیل فعالیت آسپاراژیل هیدروکسیلازی به مولکول "سوئیچ هیپوکسیک" هم شهرت دارد. این فاکتور نیز مانند PHDs برای فعالیت به اکسیژن نیاز دارد و در شرایط نورموکسی با هیدروکسیلاسیون HIF1 از اتصال آن به کواکتیواتور CBP/P300 جلوگیری می کند. کمبود اکسیژن موجب کاهش فعالیت FIH-1 و موجب اتصال HIF1 به کمپلکس CBP/P300 شده و نسخه برداری از ژن های رگ زایی آغاز می گردد. (۵۴)



شکل ۱-۱۳: نقش FIH1 و دیگر مهار کننده های HIF در شرایط هیپوکسی (۵۳)

۱-۵-۷ جایگاه سلولی و ساختار FIH-1 (FIH1)

فاکتور FIH-1 در طیف وسیعی از بافتهای انسانی بیان می شود . در حالت نورموکسی غالباً در سیتوپلاسم دیده می شود. از لحاظ ساختاری در مطالعات کریستالوگرافی اشعه X فاکتور FIH-1 از اکسیژنازهای وابسته به اگزوگلوکوتارات است . این مولکول در شکل همودایمر قادر به شناسایی سوپسترا و فعالیت کاتالیتیکی است و حذف HIF1 CAD مانع از هیدروکسیلاسیون توسط آن می گردد.

هر گونه تغییرات کاهش غلظت اکسیژنی در سلول با کاهش اثر کاتالیتیکی همراه است و نقش حس گر های اکسیژن سلولی را ایفا می کند. حداکثر فعالیت HIF1 در کاهش فعالیت FIH-1 و در شرایط هیپوکسی شدید رخ می دهد.

در تجربیات سلولی در شرایط هیپوکسیک کاربرد siRNA ژن FIH-1 با افزایش HIF1 و در نتیجه افزایش mRNA ژن VEGF همراه بوده است و برعکس با افزایش بیان FIH-1 ، کاهش بیان mRNA ژن VEGF را در پی داشته است . این شواهد نشان دهنده اثر مهارى FIH-1 در سطح نسخه بردارى در شرایط کاهش سطح اکسیژن سلولی است. (۵۵)

۱-۵-۸ انواع تنظیم FIH-1 در سلول

- ۱- تنظیم پروموتور FIH-1 به وسیله پروتئین کیناز C گاما (δ -PKC): به نظر می رسد با اتصال به عناصر Cis پروموتور مانع از نسخه برداری FIH-1 می گردد. در آدنوکارسینومای سلول های کلیه (RCC) با کاهش و نقص VHL با فسفریلاسیون پروموتور توسط پروتئین کیناز C و مهار نسخه برداری FIH-1 بیان ژن های هدف HIF1 فعال شده و موجب وخامت بدخیمی می شود.
- ۲- تنظیم به وسیله میکروارنا miR-31 در کارسینومای سروگردن (HNSCC) بررسی و تأیید شده است. میکروارنا miR-31 در کاهش FIH-1 mRNA نقش دارد و افزایش اکتوپیک آن خصوصیان تومورزایی مانند پرولیفراسیون و مهاجرت سلولی را افزایش می دهد. افزایش miR-31 در سایر بدخیمی ها مانند کانسر کولون و کارسینوم زبان نیز گزارش شده است.
- ۳- تنظیم بیان FIH-1 توسط نیتریک اکسید (NO) مستقیم و مهاری است. نیتریک اکسید به طور رقابتی با اکسیژن در اتصال به آهن دو ظرفیتی سایت فعال آنزیم موجب نیتروزیلاسیون FIH-1 می شود.
- ۴- مولکول (FIH-1) در طی هیدروکسیلاسیون از واسطه های تری کربوکسیلیک اسید حلقوی (cAMP) استفاده می کند و توسط سوکسینات و فومارات تنظیم می گردد.
- ۵- تنظیم FIH-1 تحت سلولی به وسیله متالوپروتئینازهای غشایی مانند MT1-MMP موجب افزایش این فاکتور در اطراف هسته ای می شود.

۱-۵-۹ نقش FIH-1 در تومور های جامد

- اهمیت فاکتور FIH-1 را می توان را با عواقب ناشی از عدم مهار مسیر HIF و نقش هیپوکسی در تومورهای جامد توجیه نمود:
- تجمع تغییرات ژنتیکی یک اصل پذیرفته شده در پیدایش تومورهای جامد است. این تغییرات با تاثیر بر تکثیر موجب رشد ، بقا سلول و تسریع جمعیت سلول های توموری می شود. رشد سریع سلولی با افزایش شبکه عروق نواحی هیپوکسیک تومورهای جامد هماهنگ نیست.

ارزیابی اکسیژن بافت توموری به وسیله الکترودهای حساس به اکسیژن دیده شده نواحی هیپوکسیک ۵۰-۶۰٪ تومورهای جامد را تشکیل می دهد که این مناطق هیپوکسیک با تهاجمی بودن فنوتیپ تومور ارتباط دارد .

البته این گونه بافت ها نسبت به رادیوتراپی و شیمی درمانی مقاومت نشان می دهند. امروزه با استفاده از مکانیسم های مختلف و عوامل کموتراپوتیک برای اکسیژن رسانی و افزایش سیتوتوکسیتی سلول استفاده می شود .

مولکول HIF موجب افزایش مقاومت به کموتراپی و رادیو تراپی یونیزان می شود .این نشانگر زیستی به عنوان پیش آگهی دهنده مرتبط با فنوتیپ تهاجمی تومور در بسیاری از بدخیمی ها شناخته شده است. افزایش HIF در انواع بدخیمی ها مانند پستان، پوست، ریه، مثانه، کولون، پانکراس، مغز، معده، تخمدان و کلیه گزارش شده است . همچنین با پیش آگهی ضعیف در انواع سرطان های انسانی از جمله پستان، تخمدان، مغز، سرویکس و کولون ارتباط دارد و نقص HIF موجب مهار رشد تومور می گردد.

مسیر HIF از مسیرهای اصلی در سلول بدخیم است که می تواند نسبت به تغییرات ریز محیطی داخل تومور سازش پیدا کرده و نسخه برداری از ژن های مورد نیاز برای سرطان زایی را فعال کند. فنوتایپ و نشانه اصلی این سرطان ها رشد نامحدود و خود افزایی سیگنالهای رشد و غیرحساس بودن این سلول ها به سیگنال های ضد تکثیر، مهارآپوپتوز، افزایش گلیکولیز، آنژیوژنیز و متاستاز می باشد.

مهارگر فاکتور HIF یا (FIH-1) با کنترل و تنظیم منفی مسیر هیپوکسی در تومور می تواند از بیان فاکتورهای پروآنژیوژنیک و در نتیجه رشد و متاستاز تومور جلوگیری کند.

بنابراین به نظر می رسد علاوه بر مهار $HIF1\alpha$ ، ارزیابی میزان بیان فاکتورهای مرتبط با $HIF1\alpha$ مانند پروتئین های مهارگران به نام HIF1AN (Hypoxia inducible factor 1 inhibiting subunit α) یا فاکتور FIH1 در تشخیص بدخیمی بسیار اهمیت دارد.

۱-۵-۱۰ الگوی بیان فاکتور FIH-1 در انواع سرطان های انسانی

امروزه دانش ما در مورد بیان FIH-1 محدود به تحقیقات مختصر و پراکنده است.

ابتدا FIH-1 به عنوان یک پروتئین مرتبط با HIF شناخته شد، سپس اطلاعات مربوط به توالی بیان شونده

(Expression Sequenced Tag) نشان داد ، FIH-1 در طیف وسیعی از سلول ها مغز، ماهیچه، قلب ، لنف

، تخمدان ، پروستات ، پستان ، کولون و غیره نیز بیان می شود. (56)

بیان فاکتور FIH-1 توسط مونوکلونال آنتی بادی های ضد فاکتور FIH-1، در بافت های سالم و سرطانی بررسی شده است.

مطالعه مقایسه کارسینوم کلیه (RCC) با بافت نرمال نشان داد که اگر چه بیان FIH-1 در کارسینوم کلیه نسبت

به بافت سالم کلیه افزایش نشان داشت ، اما با وجود افزایش بیان FIH-1 فعالیت هیدروکسیلازی آن بر روی HIF

کامل نبود که ناشی از شرایط هیپوکسیک تومور بود زیرا در پی کاهش فشار اکسیژن فعالیت آنزیمی وابسته به

اکسیژن FIH-1 کم شده بود. (57)

در سرطان پستان ، بیان تحت سلولی فاکتور FIH-1 و تغییر در پراکندگی و توزیع سلولی آن و نیز قرارگیری هم زمان آن با سوبستراهایش در هسته یک فاکتور مهم شناخته شده است.

تان و همکارانش در مطالعه خود بر روی سرطان پستان مهاجم FIH-1 را در بیش از ۸۰٪ بافت سرطانی مشاهده

کردند، در ۴۸٪ موارد هم در هسته و هم در سیتوپلاسم مثبت است و موارد ۱۸٪ و ۱۴٪ تنها در سیتوپلاسم و یا

هسته منحصرا مثبت بود و جابجایی بین هسته و سیتوپلاسم یک پدیده تنظیمی است.

در تومور هایی با درجه تمایز بالا بیان هسته ای فاکتور FIH-1 سلول های توموری و بیان انکوژن CA9 کاهش یافته بود و با افزایش احتمال طول عمر بیماران ارتباط داشت.

بر عکس در تومور هایی با درجه تمایز کم فاکتور FIH-1 از هسته خارج شده بود و بیان انکوژن CA9 بیشتر بود و شیوع عود بیماری در آن ها نیز افزایش داشت .

بنابراین به نظر می رسد بیان هسته ای FIH-1 موجب کاهش نسخه برداری از HIF و کاهش شدت وخامت تومور می شود بنابراین احتمال تهاجمی شدن تومور در بیان خارج هسته ای بیشتر است. سلول های سرطانی که انواعی از موتاسیون های ژنی موثر بر خروج FIH-1 از هسته را داشتند ، به علت افزایش بیان ژن های هدف فاکتور HIF تهاجمی تر بودند.(۵۸)

۱-۶-۱ مروری بر مطالعات گذشته

شواهد نشان می دهد بیان فاکتور FIH-1 در سرطان سلول های بزرگ ریه در اغلب نمونه ها به صورت سیتوپلاسمیک بود و تعداد کمی از تومورها رنگ آمیزی واضح هسته ای از خود نشان دادند. (۵۹) برخلاف تومور کلیه در تومور اندوکراین پانکراس (PEA) قرارگیری سیتوپلاسمی FIH-1 با وخامت و متاستاز تومورهای پانکراس ارتباط داشت.(۶۰) هیپوکسی (کاهش فشار اکسیژن) یکی از علل شکست و عدم موفقیت در رادیوتراپی و شیمی درمانی تومور های جامد می باشد. (۶۱, ۶۲) همراهی FIH1 (factor inhibiting HIF) با سرکوبگر تومور (VHL) در فراخوانی هیستون داستیلازها و در نتیجه مهار اتصال HIF به کوآکتیواتور های DNA می شود و موجب غیرفعال شدن و تخریب آن می گردد که در نتیجه کلیه ژن های هدف HIF مانند پروآنژیوژنیک فاکتورها نیز مهار می شوند.(۵۶) امروزه استفاده از مهار کننده های فاکتور $HIF1\alpha$ و تنظیم پروتئین های مرتبط با آن از هدف های نوین درمانی سرطان به شمار می آیند، بررسی ها نشان داده است با مهار $HIF1\alpha$ ، مقاومت های دارویی و نیز القارگ زایی (آنژیوژنز) در کانسر کولون ، کانسر پروستات و گلیوما نیز مهار می شود.(۶۳) در تحقیقات مربوط به کانسر کولون وجود موتاسیون ژن KRAS و هیپوکسی در ایجاد مقاومت به درمان و رفتار تهاجمی تومور و طول عمر کم بیمار به هم شباهت دارند ، موتاسیون KRAS به عنوان مارکرهای پیش آگهی دهنده بیماری است. (۴۳)

در کانسر کولون، ارتباط بین انکوژن KRAS و موتاسیون ژن HIF1 α ، افزایش آنژیوژنز به واسطه HIF1 α و پیش آگهی ضعیف بیماری گزارش شده است. (۶۴)

هایپرمتیلاسیون پروموتور و کاهش بیان SOCS3 در اولسراتیو کولیتیس مرتبط با کانسر کولون نیز مطالعه و تأیید شده است، مسیر MAPK با فعال سازی STAT، نسخه برداری از ژن SOCS3 را تقویت می کند و SOCS3 با مهار RAS/GAP 120 موجب مهار MAPK pathway می شود. (۵۰)

علی رغم ارتباط (cross talk) انواع مسیرهای سیگنالینگ از جمله، میتوز فعال شده توسط پروتئین کیناز (MAPK) با دو سیگنالینگ JAK-STAT و Angiogenesis، اما تاکنون میزان بیان پروتئین HIF1 α و بیان SOCS3 در بیماری آدنوکارسینومای کولون انسان واجد موتاسیون KRAS و مقایسه با تومورهای KRAS غیر موتانت (وحشی) مطالعه ای صورت نگرفته است.

تاکنون در ایران الگوی توزیع سلولی و میزان بیان ژن و پروتئین FIH-1 در سرطان کولون دارای موتاسیون Kras بررسی صورت نگرفته است بنابراین این بررسی در نوع خود نوین، ارزشمند است و در فهم هرچه بهتر نقش فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی این مولکول اهمیت بسیار دارد.

به همین منظور در این پروژه، آنالیز موتاسیون KRAS و ژنوتایپینگ موتاسیون آن به روش پائروسکوئسنینگ انجام شد. نقش موتاسیون انکوژن KRAS بر الگوی بیان بافتی و مولکولی فاکتور FIH-1 و بیان مولکولی SOCS3 (مهارگر مسیر JAK-STAT) در بیماران آدنوکارسینومای کولورکتال مورد بررسی قرار گرفت و ارتباط بین موتاسیون KRAS با پارامترهای کلینیکی پاتولوژیک و میزان بیان دو ژن فوق به عنوان نشانگر بیولوژیک پیش آگهی دهنده احتمالی جهت کاربرد در پانل های تشخیصی و طبقه بندی مولکولی تومور کولون ارزیابی شد.

اهداف و فرضیات (OBJECTIVE & HYPOTHESIS):

الف-هدف اصلی طرح (General Objective):

آنالیز موتاسیون KRAS و تعیین میزان بیان ژن و ارزیابی بافتی پروتئین HIF1AN به عنوان بیو مارکر پیش آگهی دهنده احتمالی آدنوکارسینومای کولورکتال انسانی

ب-اهداف فرعی (Specific Objectives):

۱-آنالیز انکوژن Kras در آدنوکارسینومای کولون

۲-بررسی مقدار بیان ژن HIF1AN در آدنوکارسینومای کولون

۳-بررسی بیان پروتئین HIF1AN در آدنوکارسینومای کولون

۴-بررسی مقدار بیان ژن SOCS3 در آدنوکارسینومای کولون

ج-اهداف کاربردی (Applied Objectives):

1-استفاده از *kras* و *HIF1AN* و *SOCS3* به عنوان مارکریولوژیک پیش آگهی دهنده (prognostic

(biological marker

۲- استفاده از *kras* و *HIF1AN* و *SOCS3* در طبقه بندی مولکولی آدنوکارسینوم کولون molecular

(classification)

د-فرضیه ها (Hypothesis) یا سؤال های پژوهش:

1- آیا میزان بیان ژن HIF1AN در بیماران آدنوکارسینومای کولون *kras* wt و *kras* mut متفاوت است؟

۲- آیا بیان پروتئین بافتی HIF1AN در بیماران آدنوکارسینومای کولون *kras* wt و *kras* mut متفاوت است؟

۳- آیا میزان بیان ژن SOCS3 در بیماران آدنوکارسینومای کولون *kras* wt و *kras* mut متفاوت است؟

فصل دوم

مواد و روش

۲-۱-۱ دستگاه ها و وسایل مورد استفاده:

- (۱) هود میکروبیولوژی
- (۲) سانتریفوژ یخچال دار
- (۳) فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد
- (۴) فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد
- (۵) یخچال ۴ درجه سانتیگراد
- (۶) میکروتیوب ۰.۲، ۰.۶، ۱.۵ میلی لیتری
- (۷) لوله فالكون (15، ۵۰ میلی لیتری)
- (۸) سرنگ سمپلر اتوکلاو شده
- (۹) میکروسانتریفوژ یخچال دار
- (۱۰) دستگاه ترموسایکلر
- (۱۱) دستگاه الکتروفورز عمودی
- (۱۲) دستگاه ترموبلاک
- (۱۳) دستگاه شیکر تایمردار
- (۱۴) دستگاه همزن مغناطیسی
- (۱۵) سمپلر متغیر (۰.۵ تا ۱۰ μ l، ۱۰ تا ۱۰۰ μ l، ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ μ l)
- (۱۶) لوله آزمایش و جالوله ای
- (۱۷) سرسمپلر RNase free
- (۱۸) دستگاه اتوکلاو
- (۱۹) تیوپ PCR
- (۲۰) تیوپ اپندروف 0.5 و 1.5

- (۲۱) پلیم ۲۴ عددی Pyro sequencing
- (۲۲) میکروسکوپ نوری
- (۲۳) سینی ژل (Tray) و شانه
- (۲۴) ترازوی دیجیتال
- (۲۵) دستگاه ثبت نتایج ژل الکتروفورز Gel documentation
- (۲۶) دستگاه تابنده اشعه ماورابنفش UV-Transilluminator
- (۲۷) دستگاه (Nanodrop) ND-1000 Spectrophotometer شرکت ترموساینترفیک
- (۲۸) دستگاه Real time Light Cyclor 480 ROCHE
- (۲۹) پوشش اپتیکال پلیم Real time
- (۳۰) پلیم ۹۶ خانه ای مخصوص Real time
- (۳۱) کامپیوتر و نرم افزار آنالیز نتایج Real time
- (۳۲) کامپیوتر و نرم افزار آنالیز نتایج pyrosequencing
- (۳۳) دستگاه پایروسکوئسنسینگ Q24 کیازن PyroQiagenPyro Mark Q96 ID
- (۳۴) دستگاه تامین کننده برق power supply
- (۳۵) اسلاید ایمنوهیستوشیمی
- (۳۶) میکروفر
- (۳۷) جار مر طوب
- (۳۸) سینی کار مجهز به سیستم خلا

۲-۱-۲ مواد و محلول های مورد استفاده

- (۱) محلول PBS
- (۲) اتانل ۷۰ درجه
- (۳) پرایمرهای فرادست (Forward) و فرودست (Reverse)
- (۴) کیت تخلیص (FFPE) QIAamp DNA mini Kit شرکت کیاژن
- (۵) کیت تخلیص RNA توسط کیت RNasy FFPE Kit QIAgen
- (۶) آنزیم High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits شرکت ABI
- (۷) کیت سایبر گرین RealTimePCR Sybr[®] Green PCR Kit QuantiNova[™] شرکت کیاژن
- (۸) آنتی بادی بر ضد HIF1AN (ab92498), RabMab[®]
- (۹) آگار- آگار
- (۱۰) بافر TAE
- (۱۱) Gel loading Dye (Fermentase)
- (۱۲) DNA Ladder 100 bp plus شرکت GENE ON
- (۱۳) اتیدیوم برماید
- (۱۴) رنگ اتوزین همتوکسیلین
- (۱۵) گزیلول الکل
- (۱۶) آب مقطر استریل
- (۱۷) اتانل الکل
- (۱۸) سیستم آشکار گر EnVision[™] +dual link system-HRP (Dako)
- (۱۹) KRAS Pyro kit شرکت کیاژن (Catalog No. 970460)

۲-۲) تخلیص DNA از بلوک فیکس شده با فرمالین QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

- ۱- پارافین زدایی : ابعاد ۵-۱۰ میکرومتر از بلوک پارافینه توسط دستگاه میکروتوم برش داده شد، درون تیوپ ۱,۵ ml قرار گرفت و با 1ml زایلن (xylene) به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط و سپس ۲ دقیقه در دمای ۲۵ - ۱۲ درجه سانتیگراد با دور ۱۴۰۰۰ سانتریفوژ شد.
- ۲- مایع رویی (زایلن) به وسیله سمپلر تخلیه کامل شد.
- ۳- 1ml اتانل ۱۰۰٪ (Merck) و سپس ۱۰ ثانیه مخلوط و ۲ دقیقه سانتریفوژ ۱۴۰۰۰ اضافه شد.
- ۴- اتانل و قرار دادن تیوپ حاوی بافت در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه تخلیه کامل شد.
- ۵- **لیز کردن بافت:** ۱۸۰ میکرولیتر از بافر هضم کننده (ATL Buffer) به همراه ۲۰ میکرولیتر proteinase K به تیوپ حاوی بافت اضافه و به آرامی vortex شد.
- ۶- سپس دو مرحله شرایط دمایی بر روی ترمومیکسر ابتدا در 56 درجه سانتیگراد و سپس در 90 درجه سانتیگراد هر کدام به مدت یک ساعت قرار گرفت.
- ۷- سپس در دور ۱۴۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ شد.
- ۸- ۲۰۰ میکرولیتر از بافر (AL Buffer) به همراه ۲۰۰ میکرولیتر اتانل ۱۰۰٪ (Merck) به تیوپ حاوی بافت اضافه و به آرامی vortex شد.
- ۹- محلول لیزات به ستون حاوی فیلتر مخصوص موجود در کیت جداسازی و منتقل شد.
- ۱۰- سپس ۱ دقیقه در دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد.
- ۱۱- ستون به تیوپ ۲ ml در ۲ درج دار منتقل و ۵۰۰ میکرولیتر از بافر AW1 اضافه و به آرامی میکس شد.
- ۱۲- سپس ۱ دقیقه آن را در دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد.
- ۱۳- دوباره ستون را به تیوپ ۲ ml در ۲ درج دار منتقل و ۵۰۰ میکرولیتر از بافر AW2 را اضافه و مخلوط شد.

۱۴- ۱ دقیقه در دور ۸۰۰۰ سانتیفریوژ شد.

۱۵- سپس ۳ دقیقه در دور ۱۴۰۰۰ سانتیفریوژ شد.

۱۶- ستون به تیوپ ۱,۵ ml درب دار منتقل شد و ۱۰۰ میکرولیتر از بافر TEA اضافه شد.

۱۷- میکروتیوب به مدت ۵-۱ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد.

۱۸- سپس ۱ دقیقه در دور ۱۴۰۰۰ سانتیفریوژ شد.

۲-۳) پایرووسکوئنسینگ Pyrosequencing

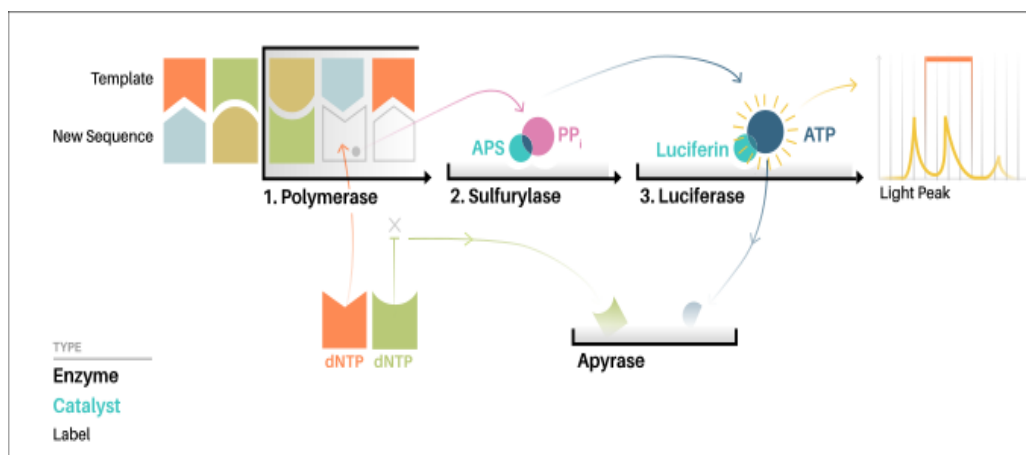
توالی یابی DNA یکی از مهم ترین روش های مطالعه سیستم های بیولوژیکی است .

شایع ترین روش آن تکنولوژی خاتمه زنجیره با دای داکسی نوکلئیک اسید می باشد، این روش در سال ۱۹۷۷ توسط آقای سانجر و همکارانش بیان شد.

در سال ۱۹۹۶ آقای مصطفی رونقی و همکارانش روش پایرووسکوئنسینگ را به عنوان یک روش پیشرفته جهت توالی یابی و تشخیص جزئیات اسیدهای نوکلئیک معرفی نمودند.

در این روش به دنبال آزادی پیرو فسفات از پلیمریزاسیون DNA با تبدیل آنزیمی PPI به ATP توسط ATP سولفوریلاز و سپس با تبدیل لوسیفیرین به اکسی لوسیفرین تحت اثر لوسیفراز باعث ایجاد نور مرئی می گردد و چون اسید نوکلئیک اضافه شده در این مرحله معین است بنابراین توالی رشته الگو نیز معین خواهد شد.

این روش در مطالعات بسیاری از جمله ژنوتایپینگ پلی مورفیسم های تک نوکلئو تیدی (SNPs) ، مطالعات شیوع الی در جمعیت های بزرگ، تایپینگ میکروبی قارچ ها و باکتری ها و ویروس ها ، توالی یابی مجدد ژن های بیماری ها و توالی یابی مجدد و کمی ژن P53 و توالی یابی ژن cDNA کتابخانه ژنومی انسان و مطالعات ژن های انکوژن از جمله KRAS مورد استفاده و تائید شده است (65).



۱-۲) شکل نمای شماتیک از روش پایروسکوئنسینگ

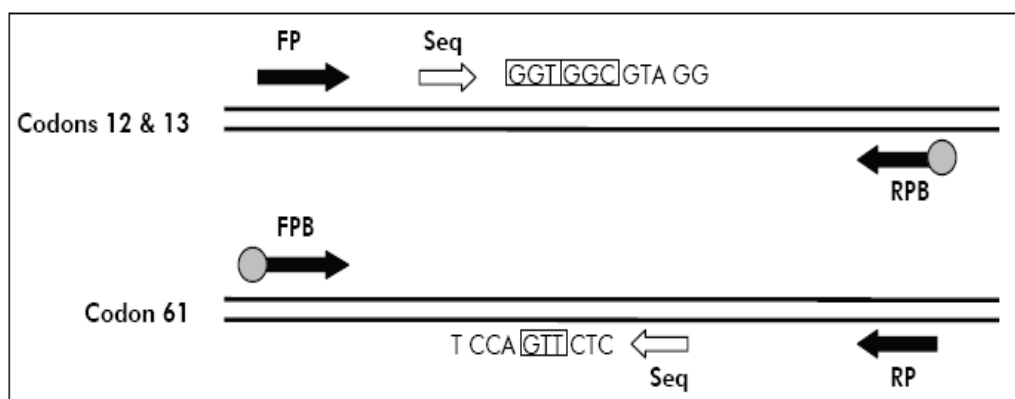
۱-۳-۲) تکثیر اولیه از ژن KRAS با استفاده از معرف های KRAS Pyro kit

بعد از ایزولاسیون DNA نمونه بافت بیمار توسط کیت تخلیص ، نمونه تخلیص شده DNA به وسیله

پرایمرهای اختصاصی کدون ۱۲، ۱۳ و ۶۱ با استفاده از پرایمرهای موجود در کیت تکثیر می شود.

پرایمر فرودست (Reverse) مورد استفاده در این مرحله بیوتینه (Biotynated) بوده و به همین جهت قطعات

حاصل از تکثیر با آن نیز مارکر بیوتین خواهند داشت .



۲-۲) شکل نمای نحوه اتصال پرایمر های فرادست و فرودست بیوتنيله

کنترل مثبت DNA Unmethylated (غیر متیله) درون کیت و کنترل کنفی چاهک بدون DNA است.

۱-۲) جدول مقادیر مورد نیاز در PCR (تکثیر آمپلیکون KRAS 12/13 or 61)

Reagent	Volume
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12.5 µl
CoralLoad Concentrate, 10x	2.5 µl
PCR Primer KRAS 12/13 or PCR Primer KRAS 61	1µl
Water (supplied)	4µl
DNA	2-10 ng/µl
Total Volume	25 µl

۲-۲) جدول مقادیر مورد برنامه PCR (تکثیر آمپلیکون KRAS 12/13 or 61)

Reaction	Time	Temperture
Initial activation HotStarTaq DNA	15 Min	95°C
Denaturation	20 Sec	95°C
Annealing	30 Sec	53°C
Extension	20 Sec	72°C
Number of cycles	42	
Final extension:	15 Min	72°C

سپس در اتاق سکانس نمونه PCR دارای آمپلیکون های بیوتینه جهت پایروسکوئنسینگ استفاده می شود.

۲-۳-۲) اتصال آمپلیکون های حاوی بیوتین به بیدهای استراپتاویدین سفارز با کارایی بالا

۳-۲) جدول مواد و محلول مورد نیاز جهت اتصال DNA به بیدهای استراپتاویدین

Component	Volume
Streptavidin Sepharose High Performance	۲ µl
PyroMark Binding Buffer	۴۰ µl
Water (supplied)	۲۸µl
Total volume	۷۰µl

مقدار ۷۰ میکرولیتر از Master mix را در هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه ای PCR اضافه و ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR بیوتینیل شده اضافه کرده و درب آن پوشانده شد و مدت ۱۰ دقیقه بر روی ترمومیکسر °C ۱۲-۲۵ درجه سانتیگراد با دور ۱۴۰۰۰ قرار داده شد تا Beads به انتهای قطعات آمپلیکون بیوتینه متصل شود.

۳-۳-۲) آماده ساز محلول ها جهت پايرو سکوئنسینگ

در این مرحله باید ترمومیکسر را روی ۸۰ درجه سانتیگراد تنظیم و محلول شستشو رقیق سازی شد. به این ترتیب که ۲۲۵ میلی لیتر از آب مقطر را با ۲۵ میلی لیتر بافر شستشو (10x PyroMark Wash Buffer) مخلوط و به حجم نهایی ۲۵۰ میلی لیتر رسید. همچنین در این مرحله نیز پرایمرهای سکوئنسینگ (seq primers) را توسط بافر اتصال (Annealing buffer) رقیق شد.

۴-۲) جدول نمونه رقیق سازی پرایمر های سکوئنسینگ

Component	Volume
Seq Primer KRAS 12/13 or Seq Primer KRAS 61	0.8 μ l
PyroMark Annealing Buffer	24.2 μ l
Total volume	25 μ l

روش رقیق سازی با اینصورت است که 0.8 میکرولیتر از پرایمر KRAS 12/13 یا Seq Primer KRAS 61 را به ۲۴،۲ میکرو لیتر بافر مخصوص PyroMark Annealing Buffer اضافه شد ، سپس ۲۵ میکرولیتر از پرایمر رقیق شده را به هر چاهک مخصوص دستگاه سکوئنسر (پلیت ۹۶ خانه ای دستگاه پائروسکوئنسینگ) اضافه و در دمای محیط قرار گرفت .

دستگاه خلا را روشن و شانه خلا را درون پلیت دارای محصول PCR بیوتینه به مدت ۱۵ ثانیه قرار گرفت تا بیدها جذب شانه شود.

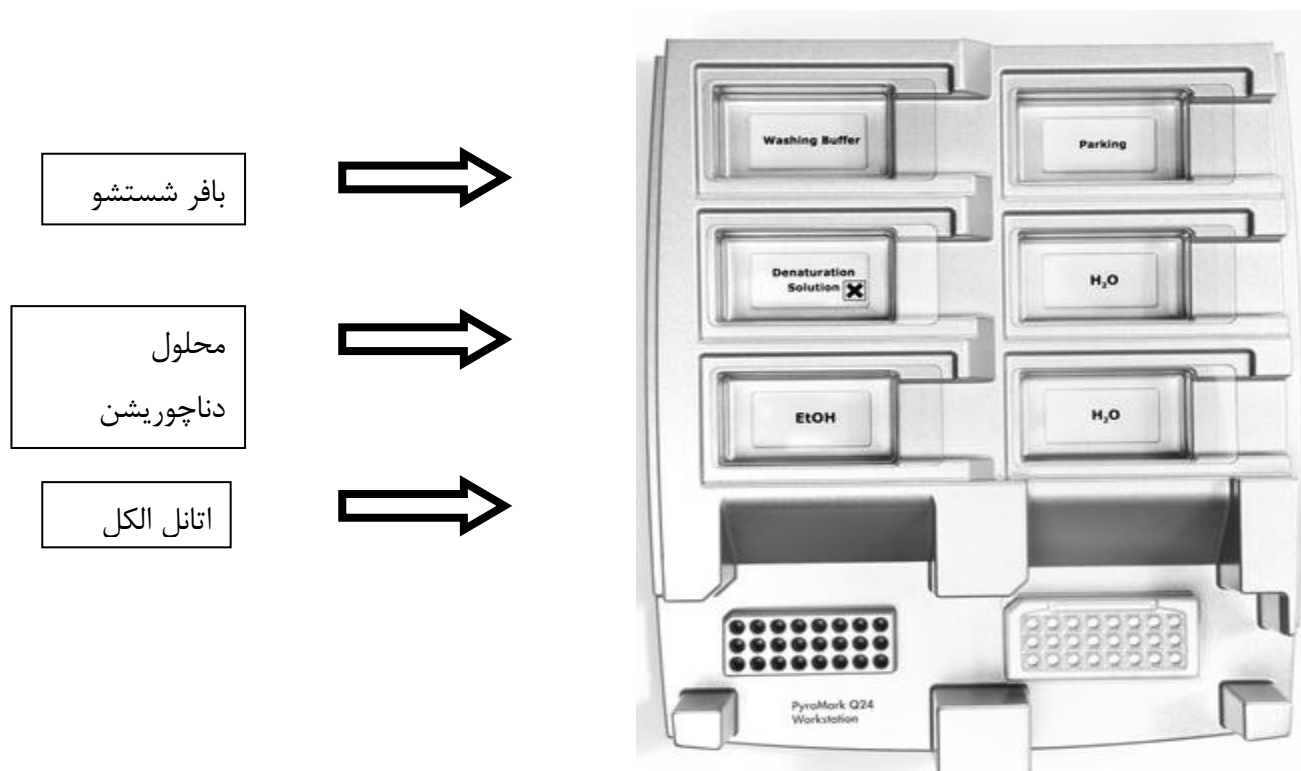
۴-۳-۲) تک رشته ای کردن DNA

۲-سینی کار (WorkStation) و دستگاه مکش (Vaccum) آماده شد، سینی کار که از چهار قسمت جداگانه تشکیل شده را به ترتیب با محلول اتانل ۷۰٪ ، محلول واسرشت کننده (دناچوریشن بافر) و بافر شستشو به ترتیب با زمان های ۵، ۵ و ۱۰ ثانیه شستشو داده شد ، سپس DNA تک رشته ای توسط بیدها (Beads) با مکش شانه مخصوص کشیده (Vaccum) شد.

۳- شانه حاوی DNA تک رشته ای متصل به بیدهای استراپتاویدین درون پلیت ۹۶ خانه ای دستگاه پائروسکوئنسینگ حاوی ۲۵ میکرولیتر پرایمر رقیق شده ویژه قطعه هدف یعنی کدون ۱۲، ۱۳ و ۶۱ قرار

گرفت و با تکان های شدید به این پلیت منتقل شد تا این بید ها از شانه رها شود سپس مدت ۵ دقیقه بر روی ترمومتر 80°C قرار گرفت.

۴- مدت ۵-۱۰ دقیقه در دمای اتاق خنک شد و در این فرصت دستگاه سکونسر آماده شد.



۲-۳: شکل دستگاه خلا و چاهک های حاوی اتانل بافر شستشو و بافر دناچوریشن

۲-۳-۵) راه اندازی سکونسر و انجام سکانس

۵- مخلوط آنزیم Enzyme mixture و مخلوط سوبسترا Substrate mixture درون ۶۲۰ میکرولیتر آب با خلوص بالا رقیق شد و کارتریج های دستگاه را به مقدار مناسب از Substrate، Enzyme mixture و نوکلئوتید آماده شد و پلیت ۹۶ خانه ای حاوی نمونه بیمار را به درون دستگاه منتقل و پس از انتخاب برنامه مورد نظر جهت توالی یابی دستگاه راه اندازی گردید.

دستگاه سکونسر PyroMark Q24 System شرکت کایژن

۲-۳-۶ سفارش توزیع نوکلئوتیدها (Dispensation Order)

در دستگاه پايرو توالی طبیعی (وحشی) و توالی های موتانت بر حسب توالی موجود در بانک ژن تایید و استفاده شد. این توالی بر حسب بانک ژن که انوعی از همه حالات ممکن را در نظر گرفته است با دقت بالایی به صورت یک سفارش توزیع نوکلئوتیدها به نرم افزار دستگاه داده شد.

هنگام پلیمریزاسیون وقتی نوکلئوتیدها به ترتیب اضافه می شود چنانچه مکمل نوکلئوتید رها شده وجود داشته باشد کمپلکس آنزیمی که در سر رشته قرار دارد، نوکلئوتید مکمل را متصل می کند و چنانچه مکملی نباشد توسط آنزیم تخریب گر، نوکلئوتید امحاء و نوکلئوتید بعدی رها خواهد شد و شدت نور توسط دستگاه خوانده می شود.

چنانچه دو بازآلی یکسان مثلاً دو (GG) در توالی مورد سنجش پشت سر هم قرار داشته باشند ارتفاع پیک مربوط به آن بازآلی بیشتر خواهد شد. کنترل مثبت واکنش دی ان ا غیر متیله (DNA Unmethylated) درون کیت و کنترل منفی چاهک بدون DNA است.

۲-۴) تخلیص RNA

۲-۴-۱ ایزولاسیون RNA از بافت فیکس شده با فرمالین RNasy FFPE Kit QIAgen

۱- بافت با 1ml زایلین (xylene) به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط و سپس ۴ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ سانتریفوژ و پارافین زدایی شد.

۲- محلول زایلین به وسیله سمپلر کامل تخلیه شد.

۳- 1ml اتانل ۱۰۰٪ (Merck) اضافه و ۴ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ سانتریفوژ شد.

۴- اتانل تخلیه و تیوپ حاوی بافت در ۳۷ درجه قرار گرفت.

۵- سپس بافت با ۲۴۰ میکرولیتر از بافر هضم کننده (Digestive Buffer) به همراه ۳۰ میکرولیتر

protainase K به آرامی مخلوط شد.

۶- سپس بر روی ترمومیکسر با دور ۹۰۰ ابتدا در ۵۸ درجه سانتیگراد و سپس در ۸۰ درجه سانتیگراد هر کدام به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت.

۷- پس از مدت طی شده تیوپ به مدت ۳ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت.

۸- سپس با دور ۱۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد.

۹- محلول رویی جداسازی و Supernatant آن به تیوپ RNase Free منتقل شد.

۱۰- ۵۰۰ میکرولیتر محلول RBC یا بافر (FFPE binding buffer) اضافه و به آرامی مخلوط شد.

۱۱- ۷۲۰ میکرولیتر اتانل ۱۰۰٪ به محلول قبلی اضافه و چند مرتبه مخلوط شد.

۱۲- بلافاصله محلول فوق به ستون های صورتی رنگ حاوی فیلتر منتقل شد.

۱۳- سپس ۱ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد.

۱۴- مرحله شستشو Washing : ستون صورتی را درون تیوپ های جمع آوری collection tube قرار گرفت.

۱۵- ۵۰۰ میکرولیتر RBE (Wash Buffer) به ستون اضافه شد.

۱۶- به مدت ۱ دقیقه دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. (تکرار مجدد مرحله ۱۵ و ۱۶)

۱۷- به مدت ۲ دقیقه دور ۱۴۰۰۰ سانتریفوژ شد.

۱۸- ستون صورتی به تیوپ ۱٫۵ ml RNase در دار منتقل و ۵۰ میکرولیتر از بافر رقیق سازی (Elution Buffer) به آرامی در مرکز ستون خالی شد.

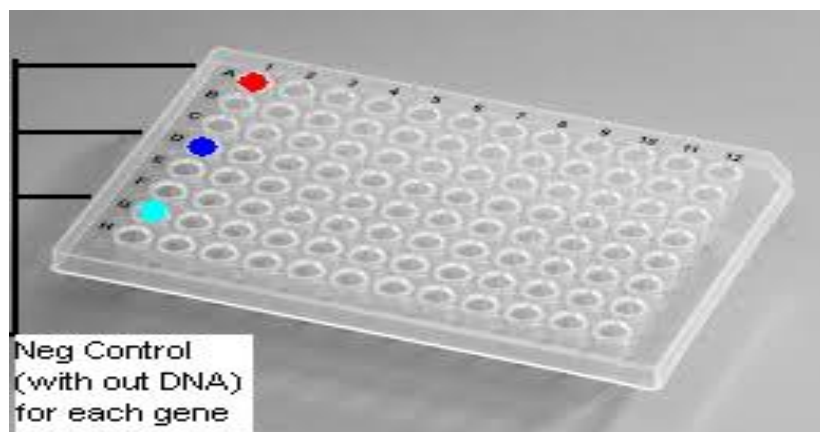
۱۹- سپس به مدت ۳ دقیقه با دور ۱۱۰۰۰ سانتریفوژ شد.

۲-۴-۲) طراحی پرایمر ژن های **HPRT** ، **SOCS3** ، **FIH1** با استفاده از نرم افزار **Allele ID v. 6.0**

۵-۲) جدول سکانس های پرایمر سه ژن **HPRT**، **SOCS3** ، **FIH1**

No	Oligonucleotide Name	Sequence (5' to 3')
N ₂₁	FIH1 Forward	CCGGATCAGTTCGAGTGC
N ₂₂	FIH1 Reverse	TTAGGGAACCTCTCGTAGTCG
N ₂₃	SOCS3 Forward	AGGAGAGCGGCTTCTACTGG
N ₂₄	SOCS3 Reverse	GACTGGGTCTTGACGCTGAG
N ₂₅	HPRT Forward	GCTATAAATTCTTTGCTGACCTGCTG
N ₂₆	HPRT Reverse	AATTACTTTTATGTCCCCTGTTGACTGG

ژن هیپوگزانتین فسفوریبوزیل ترانسفراز (**HPRT**) همیشه در بافت کولون بیان می شود و ژن رفرانس (**Housekeeping gene**) در این مطالعه است.



۲-۴: شکل نمای پلیت **PCR** و نحوه قرارگیری نمونه کنترل منفی (فاقد الگو **cDNA**)

۳-۴-۲) طول قطعه و جایگاه طراحی پرایمر بر اساس بانک ژن

NM_017902.2 Homo sapiens hypoxia inducible factor 1, alpha subunit inhibitor (HIF1AN),

mRNA

product length = 101

Forward primer 1 **CCGGATCAGTTCGAGTGC** 18

Template 736 753

Reverse primer 1 **TTAGGGAACCTCTCGTAGTCG** 21

Template 836 816

NM_003955.4 Homo sapiens suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3), mRNA

product length = 139

Forward primer 1 **AGGAGAGCGGCTTCTACTGG** 20

Template 543 562

Reverse primer 1 **GACTGGGTCTTGACGCTGAG** 20

Template 681 662

NM_000194.2 Homo sapiens hypoxanthine phosphoribosyltransfeRAsE 1 (HPRT1), mRNA

product length = 140

Forward primer 1 **GCTATAAATTCTTTGCTGACCTGCTG** 26

Template 379 404

Reverse primer 1 **AATTACTTTTATGTCCCCTGTTGACTGG** 28

Template 518 491

۲-۴-۴) مواد و مقادیر مورد استفاده در سنتز DNA تک رشته ای 1st strand cDNA

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems)

برای تهیه DNA یک رشته ای (1st strand cDNA) ترکیبات جدول ۲-۱ به حجم ۲۰ میکرولیتر تهیه شد. روش استفاده از این مواد به صورتی است که ابتدا 10 µl از RNA به همراه 2 µl از پرایمر Random Hexamer مخلوط و سپس 1 µl dNTP به غلظت (۱۰۰ mM)، 2 µl از بافر 10x آنزیم، و سپس آنزیم MultiscribeTM به اندازه ۱ میکرولیتر به آن اضافه شد. جهت واکنش پلیمریزاسیون نمونه در ابتدا دمای ۲۵°C برای مدت ۱۰ دقیقه و سپس در دمای ۳۷°C برای مدت ۱۲۰ دقیقه و در دمای ۸۵°C به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. جهت متوقف نمودن واکنش از دمای ۴°C برای مدت نا محدود استفاده شد و سپس نمونه به درون یخ انتقال یافت. این نمونه می تواند مستقیماً جهت PCR مورد استفاده قرار گیرد و یا در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری و سپس در PCR استفاده شود.

جدول ۲-۶) ترکیبات تشکیل دهنده واکنش سنتز 1st strand cDNA

Reagent	Volume	Final Concentration
Total RNA	10µl	up to 2 µg RNA/µl
10X RT buffer	2µl	
10X RT Random primers	2µl	pmol/µl
25X dNTP (100mM)	1µl	mMol/µl
Multiscribe TM Reverse transcript.	1µl	50 U/µL
Nuclease-free H2O	4 µl	
Total	20µl	

جدول ۲-۷: برنامه RT-PCR مورد استفاده در سنتز DNA تک رشته ای

Reaction	Time	Temperture
Step 1	10 Min	25°C
Step 2	۱۲۰Min	۳۷°C
Step3	5 Min	85°C
Step 4	∞ نامحدود	4°C

۲-۴-۵) مواد و مقادیر مورد استفاده در بررسی بیان ژن به روش Real Time PCR

QuantiNova™ Sybr® Green PCR Kit

جهت بررسی بیان ژن های هدف به روش سایبرگرین ریل تایم ترکیبات جدول (۲-۸) به حجم ۲۰ میکرولیتر

تهیه شد. روش استفاده از این مواد به صورتی است که ابتدا 10 µl از Master mix به همراه 2 µl از

cDNA مخلوط و سپس 1 µl از هر جفت پرایمر فرادست و فرودست هر ژن به آن اضافه شد و با H2O به حجم

رسید.

جهت انجام واکنش پلیمریزاسیون نمونه در ابتدا دمای ۹۵°C برای مدت ۱۰ دقیقه و سپس در دمای ۶۳°C برای

مدت ۳۰ ثانیه به مدت ۵۰ سیکل متوالی قرار گرفت. جهت متوقف نمودن واکنش و رسم منحنی ذوب از

افزایش دما ۶۰°C و سپس کاهش دما به ۴°C بر طبق جدول زیراستفاده شد. سپس نمونه به درون یخ انتقال

یافت.

جدول ۸-۲ مواد و محلول مورد استفاده در واکنش Real Time PCR

Reagent	Volume	Final Concentration
First strand cDNA	2µl	1ng/20µl
Sybr Green PCR Master	10µl	1X
Forward Primer (10pmol/µl)	0.5µl	(0.2pmol/µl)
Reverse Primer (10pmol/µl)	0.5µl	(0.2pmol/µl)
H2O	7 µl	
TOTAL	20µl	

جدول برنامه Real Time PCR مورد استفاده در بررسی بیان ژن SOCS3 mRNA (و HIF1AN)

mRNA

PCR Program	Temperature	Time	Cycle	Ramp Rate
Pre incubation	95 °C	5 Min	1	4.4
Amplification	95 °C	10sec	۵۰	4.4
Amplification	63 °C	30sec	۵۰	2.2
Melting Curve	60 °C	5 Min	1	4.4
Melting Curve	70 °C	1sec	1	4.4
Melting Curve	90 °C	60Min	1	0.05
Cooling	4 °C	30sec	1	2.2

برنامه فوق بر روی دستگاه Light Cycler 480 Roche تنظیم و انجام شد.

۲-۵ روش اجرای ایمنو هیستوشیمی

ابتدا اطلاعات کلینیکی پاتولوژیک سن، جنس و محل تومور مربوط به پرونده ها و گزارش های پاتولوژی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال (سالهای ۱۳۹۱ تا نیمه اول ۱۳۹۳) که تحت عمل جراحی رزکسیون کولون قرار گرفته بودند ثبت شد. اطلاعات مربوط به محل تومور در بیماران به دو دسته تقسیم شد به این صورت که تومورهای واقع در پروگزیمال به وسط کولون عرضی تومور کولون راست و دیستال به آن کولون چپ نامیده شد.

الف) بازبینی اسلایدها

به جهت یکسان سازی گزارش اسلایدهای مربوط به بیماران از لحاظ عمق تهاجم تومور، درگیری غدد لنفاوی، درجه تمایز تومور و تهاجم عروقی توسط دو پاتولوژیست دیگر نیز بازبینی و در موارد لازم از بلوک های پارافینه مربوطه اسلاید مجدد تهیه شد.

درجه تمایز تومور هم بر اساس طبقه بندی دانشگاه استنفورد به صورت زیر در جدول درج شد:

1. ☐ Well differentiated: >95% gland forming
2. ☐ Moderately differentiated: 50-95% gland forming
3. ☐ Poorly differentiated: 0-49% gland forming

عمق تهاجم تومور بر طبق طبقه بندی TNM به صورت زیر در جدول از قبل تهیه شده درج شد:

Into the submucosa but not into the muscularis propria (T1)

Into but not through the muscularis propria (T2)

Through the muscularis propria and into the subserosal fat or pericolonic or perirectal adipose tissue (T3)

Reaching the serosa or peritoneal surface Into adjacent organs (T4)

ب) بررسی ایمنوهیستوشیمی

حین بازبینی لام های پاتولوژی از ناحیه تومورال بلوک پارافینه، ابعاد چهار میکرومتر از بلوک پارافینه برش تهیه شد. سپس با توجه به راهنمای شرکت سازنده مارکر و روش های استاندارد رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی به شرح زیر اسلاید های IHC تهیه شد:

۲-۵-۱: مرحله دیپارافینه کردن

۱. لام ها در حرارت 80 درجه سانتیگراد به مدت دو ساعت نیم قرار داده شد تا خشک شود و بافت به لام بچسبد.
 ۲. در گزیلول 2 بار، 5 دقیقه قرار گرفت.
 ۳. در اتانول مطلق 2 بار، 5 دقیقه قرار گرفت.
 ۴. در اتانول 96٪: 2 بار، 3 دقیقه قرار گرفت.
 ۵. الکل 70 درجه 2 دقیقه قرار گرفت.
- در آب جاری شستشو داده شد.

۲-۵-۲: مرحله بازیافت آنتی ژن (Unmasking) و رنگ آمیزی با DAB کروموژن

1. لام ها در بافر سیترات سدیم یا pH:6 Tris-EDTA قرار داده شد و به مدت 10 دقیقه در دمای 120 درجه سانتیگراد جهت بازیافت آنتی ژن (مرحله Antigen Retrieval) اتوکلاو شد. سپس بافت ها به همراه بافر در دمای اتاق به مدت 15 دقیقه خنک شد.
 2. شستشوی لام ها در بافر PBS به مدت 15 دقیقه صورت گرفت.
- بافت ها در اتاقک مرطوب قرار گرفت، محلول آب اکسیژنه 10٪ به مدت 10 دقیقه اضافه شد.
- (محلول آب اکسیژنه : 9 میلی لیتر آب اکسیژنه در 91 میلی لیتر متانول، اتاق تاریک و مرطوب)

3. ۵ دقیقه در آب مقطر شستشو شد.
4. ۵ دقیقه در بافر PBS شستشو شد.
5. بافر اضافی از سطح لام پاک شد ، با استفاده از قلم Dako اطراف بافت محدود و مشخص شد.
6. بافت ها دوباره در اتاقت مرطوب قرار داده شد و سطح آن ها با آنتی بادی اولیه HIF1AN محصول شرکت (Abcam HIF1AN (isotype: mouse IgG1 با رقت 1:250 به شکل کامل پوشانده شد .
- بافت های شاهد منفی با بافر PBS پوشانده شد و در این مرحله اتاقت مرطوب در دمای اتاق یا دمای 37 درجه سانتیگراد به مدت 60 دقیقه قرار گرفت.
۷. 5 دقیقه در بافر PBS شستشو شد .
۸. Dako Envision HRP dual mouse/rabbit به مدت ۳۰ دقیقه اضافه و بافت ها در اتاقت تاریک قرار گرفت.
۹. جهت رقیق سازی به هر ۱ میلی لیتر Dako DAB/chromogen مقدار ۲۰ میکرولیتر بافر افزوده شد.
۱۰. ۵ دقیقه لام در بافر PBS شستشو شد .
۱۱. سطح بافت ها در اتاقت مرطوب با محلول Dako DAB/chromogen (یک قطره کروموژن در یک میلی لیتر سوپسترا) پوشانده شد و در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت.
12. ۵ دقیقه در بافر PBS قرار گرفت و در آب جاری شستشو شد.
13. رنگ آمیزی هماتوکسیلین به مدت 1 دقیقه انجام شد.
14. در آب جاری شستشو شد.
15. در اسید الکل شستشو شد.
16. به مدت ۲ دقیقه در محلول بی کربنات غوطه ور شد.
17. در آب جاری شستشو شد.
18. به مدت ۵ دقیقه در اتانول ۹۶ درجه غوطه ور شد.
19. به مدت ۵ دقیقه در اتانول مطلق غوطه ور شد.

20. به مدت ۵ دقیقه در گزیرلول غوطه ور شد. (دو بار)

21. لام ها با لامل پوشانده شد.

در هر ران کاری از بافت سرطان پستان انسان به عنوان کنترل مثبت و بافر PBS به عنوان آنتی بادی اولیه جهت رنگ آمیزی اسلاید شاهد منفی استفاده شد.

اسلایدهای ایمونوهیستوشیمیایی تهیه شده با آنتی بادی HIF1AN با اسلایدهای هماتوکسیلین اتوزین (H&E) بیماران مطابقت داده شدند و سپس از لحاظ مارکر HIF1AN بررسی شدند .

مارکر HIF1AN یک مارکر هسته ای است که در هسته سلول های توموری رنگ می گیرد .

۲-۶ نحوه شمارش و امتیازدهی اسلاید ها (SCORING)

جهت اسکوربندی بیان پروتئین بافت ها از روش اچ-اسکور (H-SCORE) استفاده شده است .

فیلد میکروسکوپی با بزرگنمایی (x400) حدود ۵۰۰ سلول توموری شمارش شد و سپس درصد سلول های توموری که هسته آن ها رنگ گرفته بود در مقدار عددی شدت رنگ پذیری (۰ = بدون رنگ ، ۱ = ضعیف، ۲ = متوسط، ۳ = رنگ پذیری قوی) ضرب شدند . در نتیجه با چهار سطح از شدت رنگ پذیری طیف اسکوربندی از (۰-۳۰۰) جهت گزارش به کار برده شد.

۲-۷ نحوه محاسبه تغییرات نسبی بیان ژن :

در این بررسی ژن هیپوگزانتین فسفوریبوزیل ترانسفراز (HPRT) که نوعی House keeping gene است و به طور ثابت در سلول روده بیان می شود به عنوان ژن رفرانس مورد استفاده قرار گرفت .
نمونه کنترل: نمونه های بافت KRAS غیر موتانت (وحشی) بود.

در این پروژه دو ژن FIH1 و SOCS3 به عنوان ژن هدف مورد بررسی قرار گرفت.

- $\Delta C_{Tcontrol} = C_{T(target\ control)} - C_{T(ref. control)}$
- $\Delta C_{Tsample} = C_{T(target\ sample)} - C_{T(ref. sample)}$
- $\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T(sample)} - \Delta C_{T(control)}$

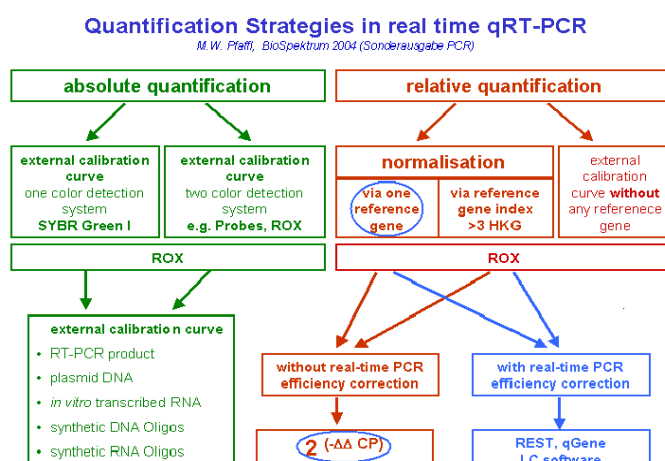
- $2^{-\Delta\Delta CT} = \text{Relative Fold change (compared to standard) in gene expression level}$

نمونه نرمال: control

نمونه مورد آزمایش: sample

ژن مورد نظر : target (SOCS3 و FIH1)

رفرانس ژن : HPRT House keeping gene



۲-۵: شکل نمای شماتیک نحوه محاسبه مقدار بیان ژن

۲-۸ آنالیز آماری

داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS و با استفاده از آزمون های تحلیل شد وارزش معنی داری کمتر از ۰,۰۵ در نظر گرفته شد.

در این مطالعه آنالیز های آماری با توجه به نوع متغیر از آزمون T-Test ، آزمون همبستگی و مجذور کای و با استفاده از نرم افزار SPSS version 16.0 صورت گرفت.

بنابر رعایت اصول تحقیق در علوم پزشکی و بالینی این پروپوزال در شورای کمیته اخلاق پزشکی مطرح و کد ۲۸/۲۰/۸۰۹۶ در خصوص عدم مغایرت با اصول هلسینکی به آن تعلق گرفت.

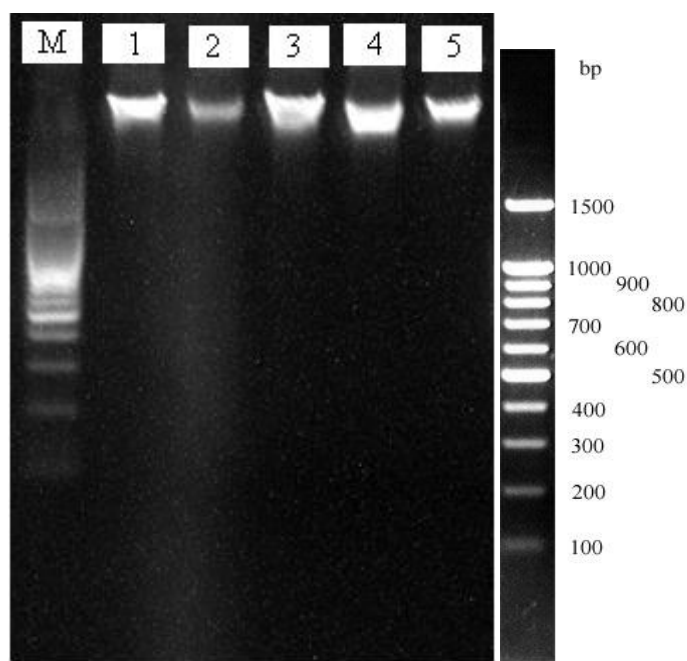
فصل سوم

نتایج

نتایج به دست آمده از این تحقیق به شرح زیر است :

۱-۳) استخراج DNA نمونه FFPE و تایید آن بر روی ژل الکتروفورزیس

مراحل استخراج DNA مطابق دستورالعمل کیت انجام و صحت مراحل استخراج بر روی ژل الکتروفورز تایید شد. (شکل ۱-۳)

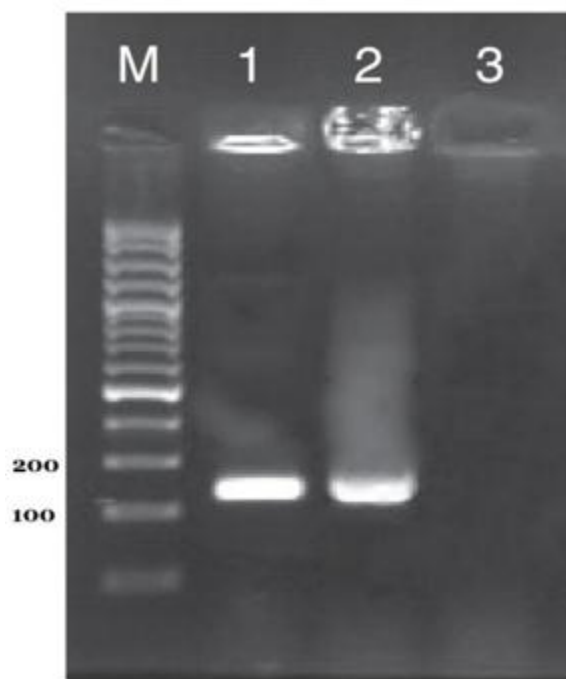


شکل ۱-۳: تایید صحت استخراج DNA از نمونه بافت تومور در چاهک ۱ الی ۵ نمونه در کنار مارکر

۲-۳) تایید تکثیر DNA ژن KRAS با استفاده از PCR

تکثیر DNA ژن KRAS مطابق دستورالعمل کیت انجام شد و محصول PCR بر روی ژل الکتروفورز شد.

(شکل ۲-۳)



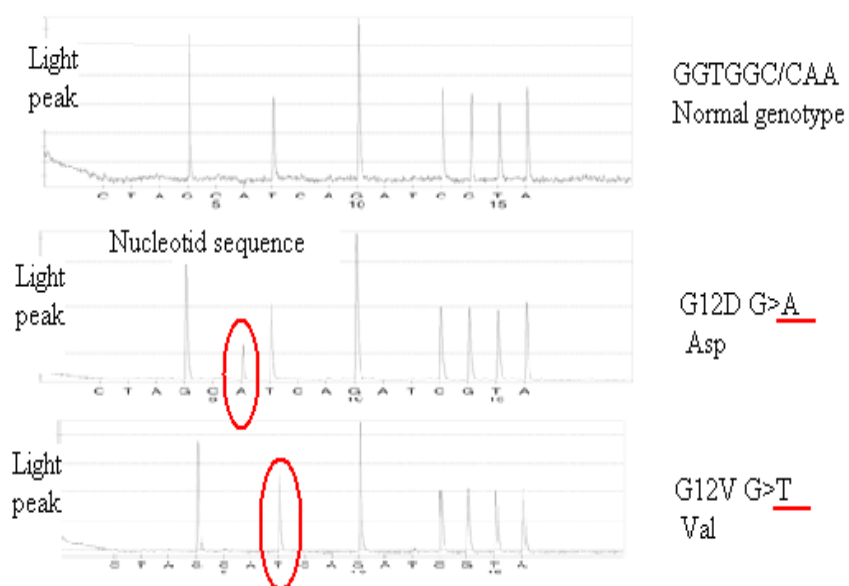
۲-۳) شکل ژل الکتروفورز ژن KRAS بافت تومور، به ترتیب در چاهک ۱ نمونه نرمال (غیر موتانت)، چاهک ۲

نمونه موتانت و چاهک ۳ کنترل منفی

۳-۳) توالی یابی قطعه آمپلیکون ژن KRAS و تعیین موتاسیون به روش پایروسکوئنسینگ

توالی یابی ژن KRAS و تعیین ژنوتایپ نمونه موتانت مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. (شکل ۳-۳)

Well	Sample ID	Result	Frequency	Codon Change	Amino Acid Substitution	Info
A1	13	Wildtype				
A2	14	Wildtype				
A3	15	Wildtype				
A4	16	Mutation (codon 12)	4,2 %	GGT>AGT	G12S	
B2	18	Wildtype				
B3	19	Wildtype				
B4	20	Mutation (codon 12)	4,6 %	GGT>AGT	G12S	
C1	21	Wildtype				
C2	22	Wildtype				
C3	38	Mutation (codon 12)	29,7 %	GGT>GAT	G12D	
C4	39	Mutation (codon 13)	42,5 %	GGC>GAC	G13D	



۳-۳) شکل نتایج دستگاه توالی یابی (پایروسکونئسینگ) به صورت جدول و گراف پایروگرام

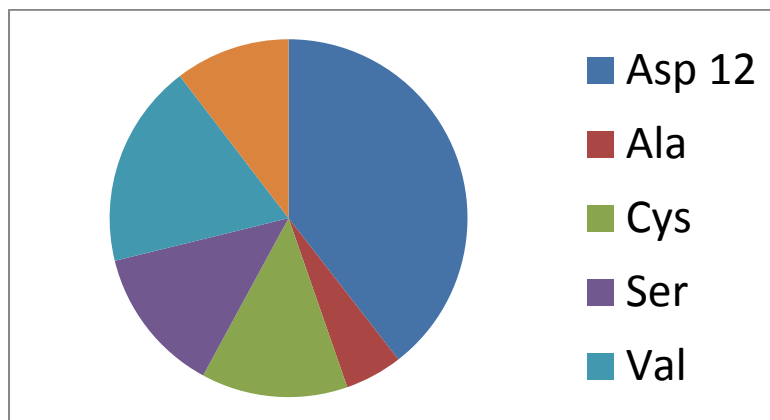
که به ترتیب از بالا به پایین گراف اول ژنوتایپ نرمال و دو گراف بعدی جایگزینی نقطه ای باز آلی گوانین با آدنین و تیمین و تبدیل اسید آمینه گلیسین به آسپارتات و والین را نشان می دهد.

با بررسی جدول نتایج و نمودارهای پایروگرام، نمونه موتانت بر اساس مکان و طول پیک تکثیر بر روی هر نوکلئوتید و مقایسه طول و جایگاه پیک تکثیر با پایروگرام کنترل (غیر موتانت) موارد دارا و فاقد موتاسیون معین شد.

در نمای پایروگرام محور طولی تشعشع نورخوانده شده توسط دستگاه و محور عرضی توالی نوکلئوتیدی مربوط به توالی موتانت و غیر موتانت طراحی شده برای ژن KRAS را نشان می دهد .

در نمودار اول ترتیب نوکلئوتید در نمونه فاقد جهش (نرمال) را نشان می دهد ، چنانچه باز آلی گوانین با هر باز آلی دیگری مانند: آدنین یا تیمین جایگزین (دچار موتاسیون نقطه ای) شود با کاهش طول پیک گلیسین و ایجاد پیک در باز آدنین و یا تیمین قابل شناسایی است ، در نتیجه اسید آمینه گلیسین (نرمال) به اسید آمینه آسپارتات و والین تبدیل می گردد و جهش رخ داده است.

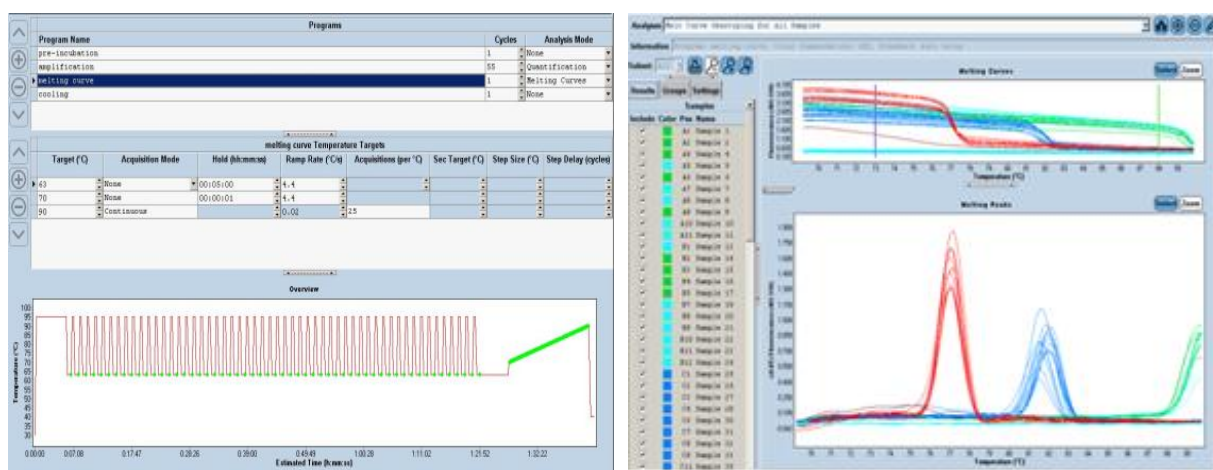
تکرار دوباز آلی مشابه کنار یکدیگر در یک توالی با افزایش طول پیک آن باز آلی بر روی پایروگرام قابل مشاهده است.



۳-۳-۱) شکل انواع موتاسیون شایع ژن KRAS و فراوانی آن ها

4-3) نتایج تکثیر اختصاصی آمپلیکون های ژن های هدف به روش Real Time PCR

نمونه های cDNA بیماران به وسیله پرایمرهای طراحی شده اختصاصی به روش qPCR برای قطعات ژن هدف SOCS3، FIH1 و HPRT در سه واکنش مجزا مورد ارزیابی قرار گرفتند . (شکل 3-4)

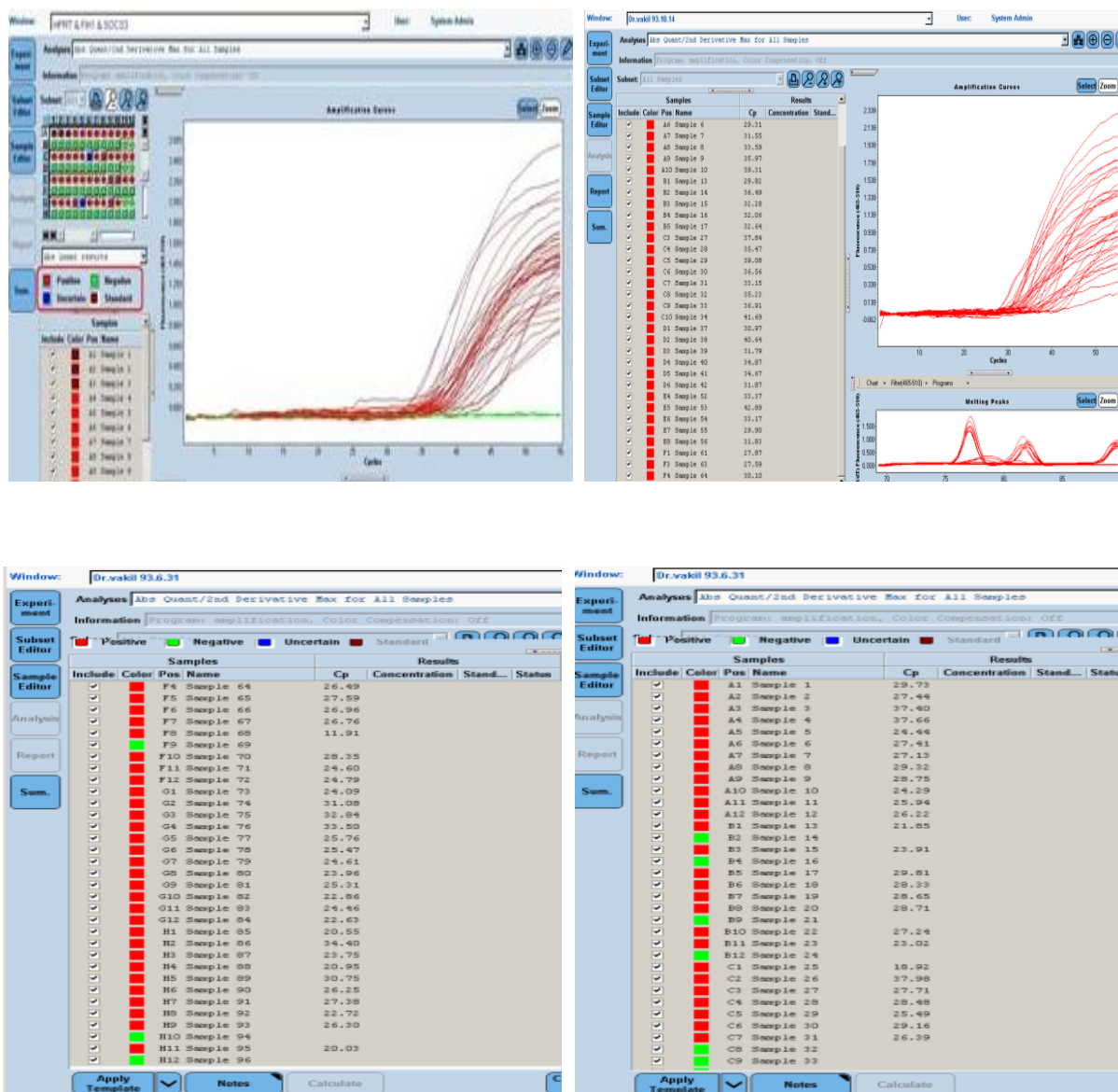


شکل 3-4) گراف راست مربوط به منحنی ذوب سه قطعه ژن HPRT (قرمز)، FIH1 (آبی) و SOCS3 (سبز)

گراف چپ مربوط به نمودار Ramp Rate

منحنی ذوب برای سه قطعه در سه درجه دمای 70°C و 60°C با رامپ ریت (R.R) برابر با 4.4°C/s درجه بر ثانیه و دمای 90°C با R.R برابر با 0.02°C/s رسم و در 4°C واکنش پایان یافت.

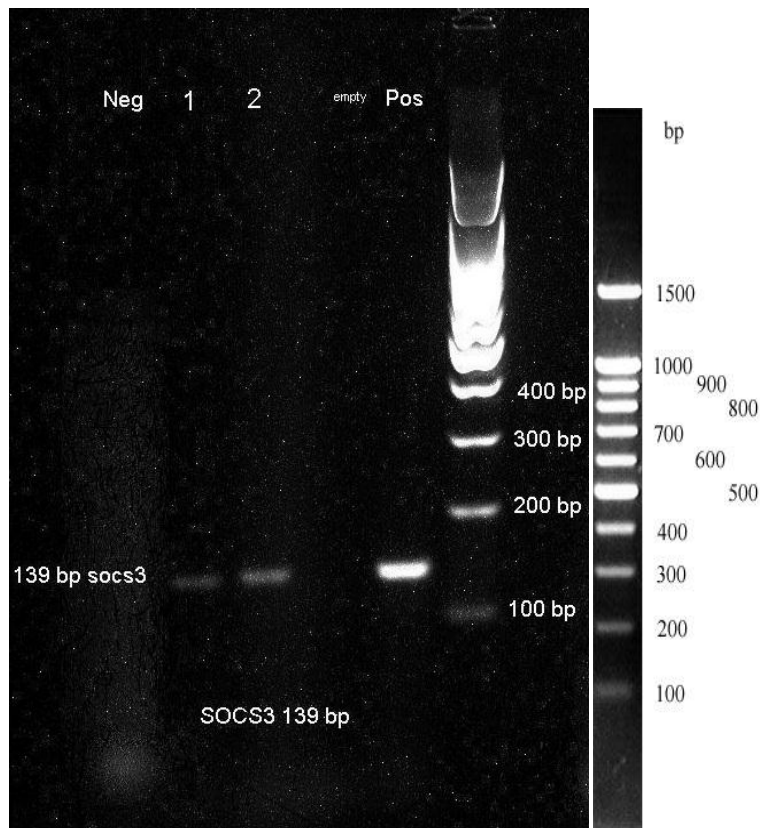
۳-۴-۱) نتایج و مقادیر Ct تکثیر اختصاصی آمپلیکون های ژن های هدف به روش Real Time PCR



شکل ۳-۴-۱) عکس مربوط به نمودار تکثیر و نتایج RealTimePCR مربوط به نمونه بیماران

۵-۳ ژل الکتروفورز از محصول Real Time PCR ژن SOCS3

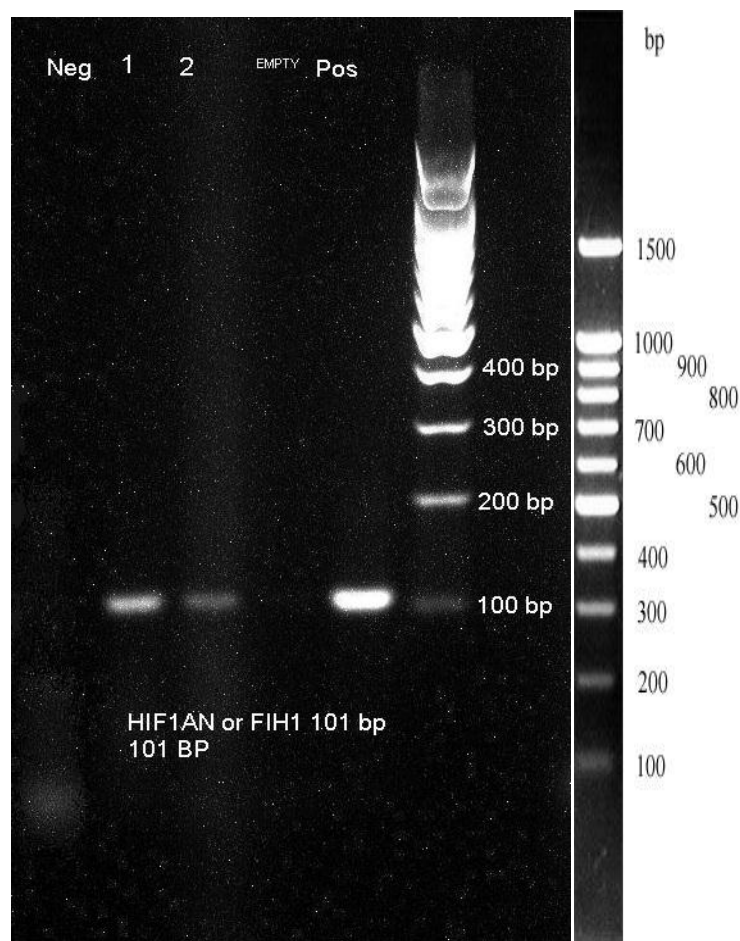
برای اطمینان از تکثیر اختصاصی آمپلیکون هدف SOCS3 محصول Real Time PCR نیز بر روی ژل آگارز الکتروفورز شد .



شکل ۵-۳) عکس ژل از محصول Real Time PCR ژن SOCS3 به ترتیب کنترل مثبت ، چاهک خالی دو نمونه از بیمار و کنترل منفی

۳-۶) ژل الکتروفورز از محصول Real Time PCR ژن FIH1

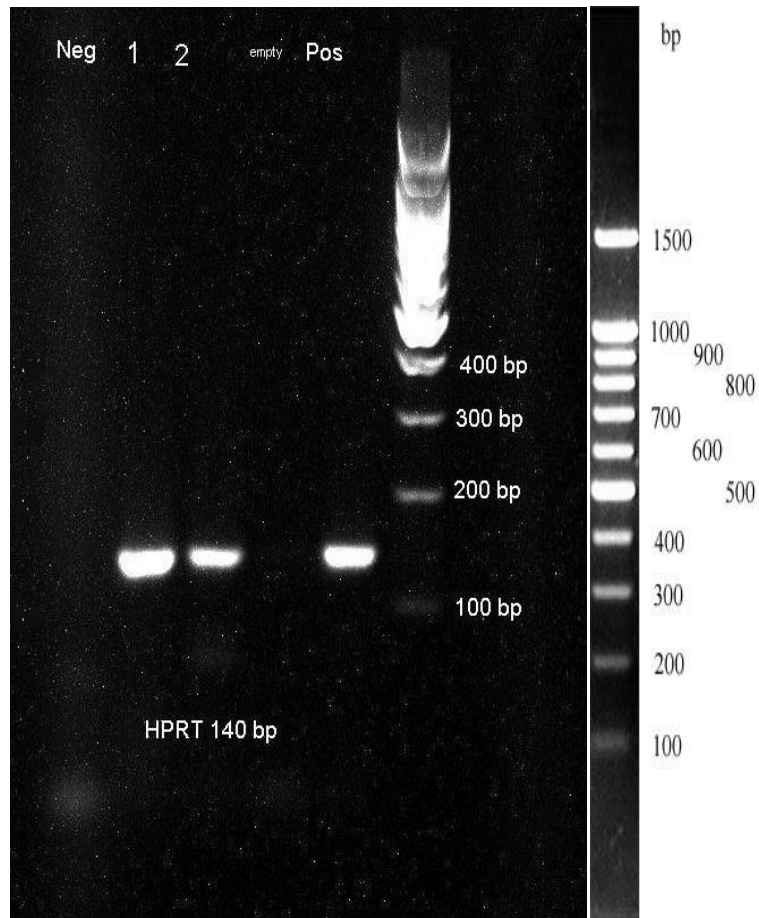
برای اطمینان از تکثیر اختصاصی آمپلیکون هدف FIH1 محصول Real Time PCR نیز بر روی ژل آگارز الکتروفورز شد.



شکل ۳-۶) عکس ژل از محصول Real Time PCR ژن FIH1 به ترتیب کنترل مثبت ، چاهک خالی دو نمونه از بیمار و کنترل منفی

۷-۳ ژل الکتروفورز از محصول Real Time PCR ژن HPRT

برای اطمینان از تکثیر اختصاصی آمپلیکون ژن HPRT محصول Real Time PCR نیز بر روی ژل آگارز الکتروفورز شد .



شکل ۷-۳) عکس ژل الکتروفورز از محصول Real Time PCR ژن HPRT به ترتیب کنترل مثبت ، چاهک خالی دو نمونه از بیمار و کنترل منفی

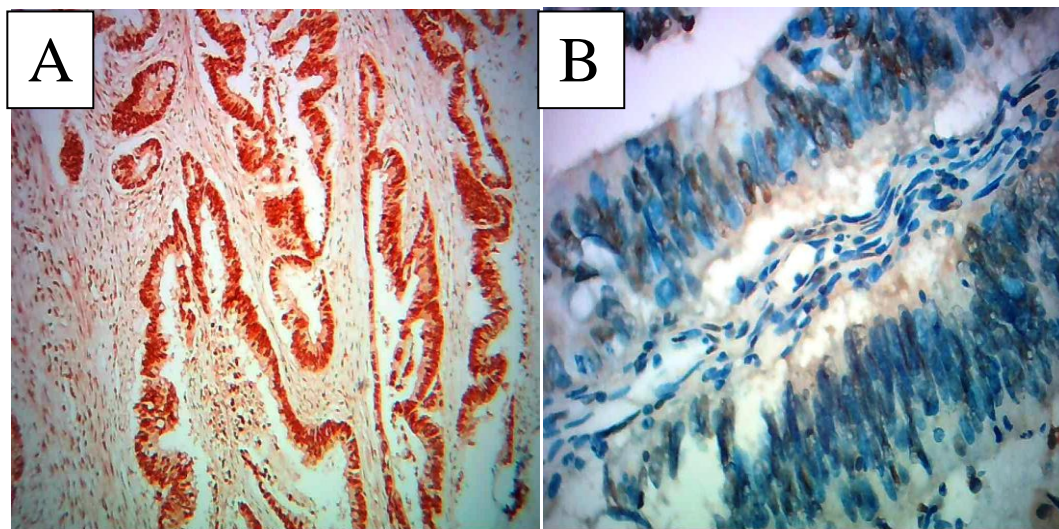
۸-۳) یافته های ایمنوهیستوشیمی

در این مرحله تمامی سطح اسلایدها از جهت رنگ پذیری آنتی بادی HIF1AN با میکروسکوپ نوری بررسی شد. لام های ایمنوهیستوشیمی از نظر شدت و وسعت رنگ پذیری مورد بررسی قرار گرفت به طوری که عدم رنگ پذیری برابر صفر (منفی)، رنگ پذیری ضعیف برابر 1، رنگ پذیری متوسط برابر 2 و شدت رنگ پذیری قوی نمره 3 در نظر گرفته شد. همچنین وسعت رنگ پذیری درصد هسته های مثبت در ۵۰۰ سلول شمارش شده محاسبه شد.

در آخر شدت رنگ پذیری و درصد تعداد سلول هایی که رنگ پذیری داشتند در یکدیگر ضرب شد و بازه آن از (۰-۳۰۰) در نظر گرفته شد.

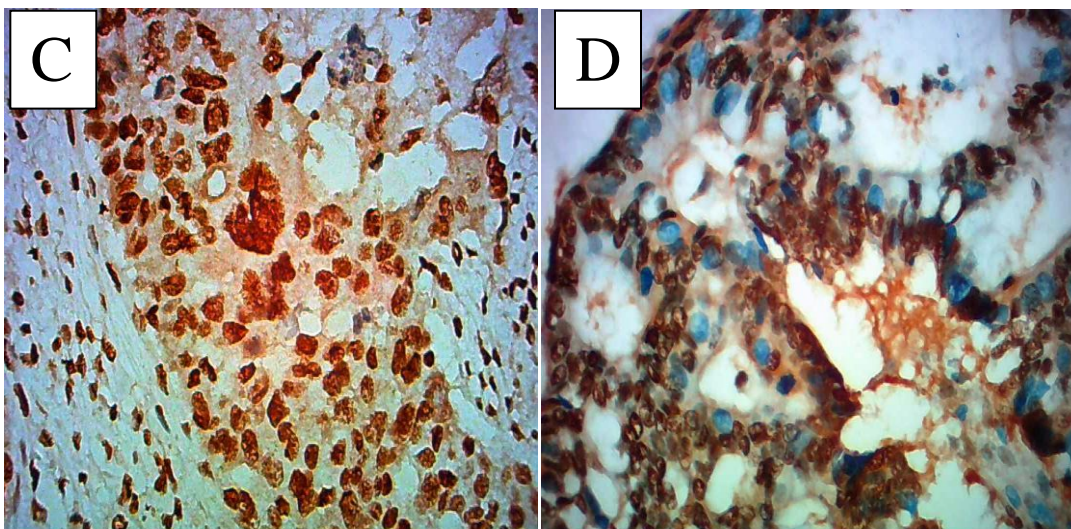
در این مطالعه بافت سرطان پستان به دلیل شدت رنگ پذیری بالا و توصیه کیت به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. (شکل ۳-۷)

در این مطالعه نمای رنگ پذیری HIF1AN به صورت هسته ای بود. همانطور که ملاحظه می شود HIF1AN پروتئین هسته ای می باشد .

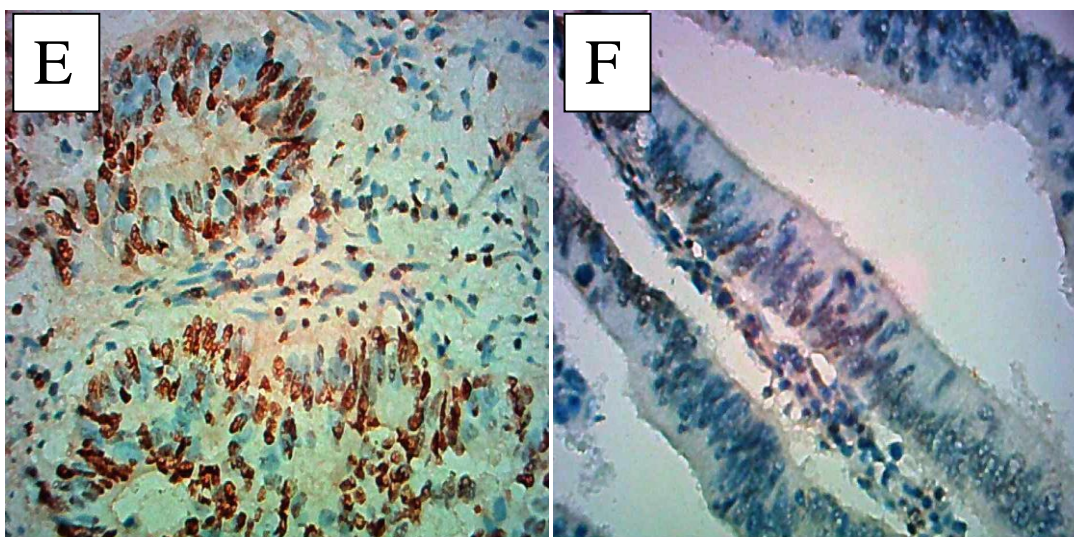


۸-۳) A شکل رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی HIF1AN سرطان پستان انسانی به عنوان کنترل مثبت

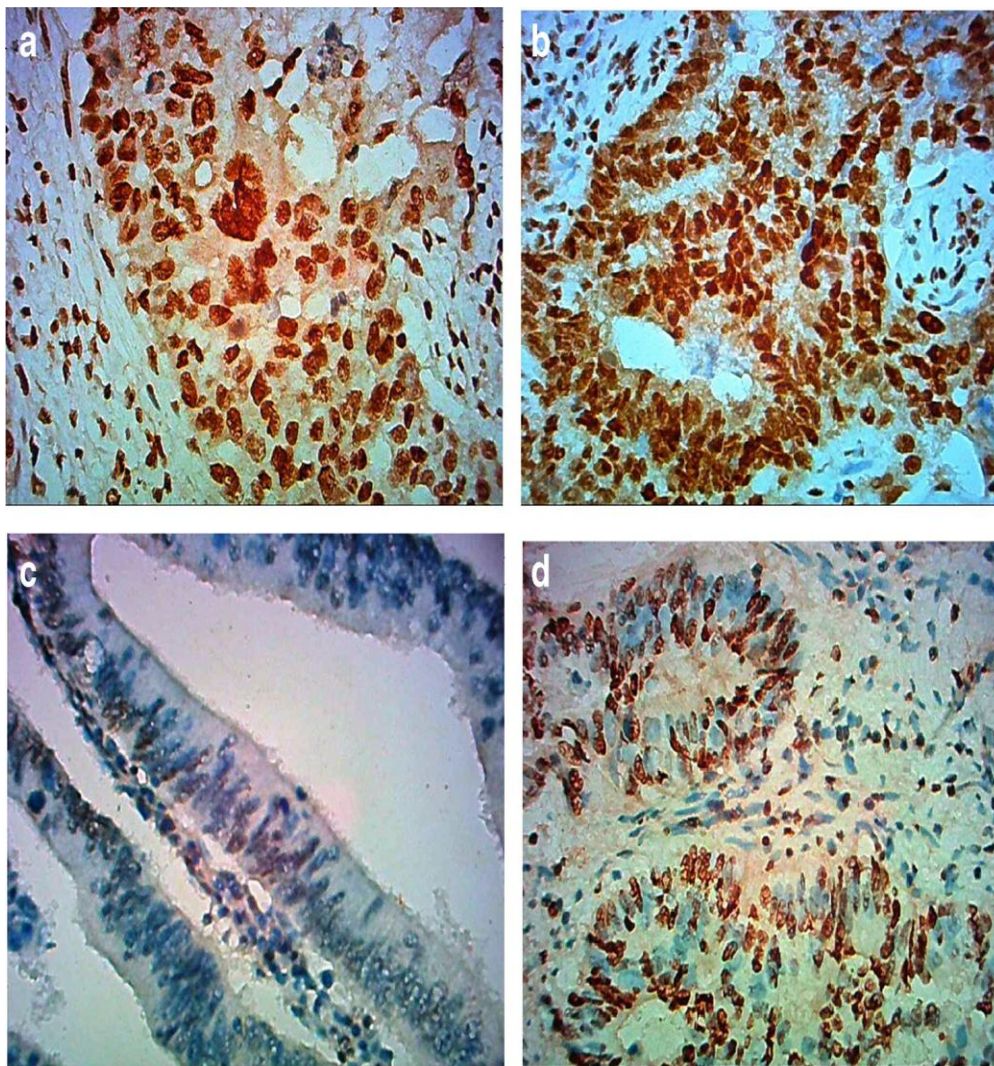
B : بافت های شاهد منفی با بافر PBS پوشانده شد



شکل ۳-۹) C بافت توموری با درجه تمایز خوب و وسعت رنگ پذیری ۹۵٪ و شدت رنگ پذیری ۲
D: بافت توموری با درجه تمایز متوسط و وسعت رنگ پذیری ۸۵٪ و شدت رنگ پذیری ۳ در بافت WT



شکل ۳-۱۰) E بافت توموری با درجه تمایز متوسط و وسعت رنگ پذیری ۴۰٪ و شدت رنگ پذیری ۱
F بافت توموری با درجه تمایز ضعیف و وسعت رنگ پذیری ۴۰٪ و شدت رنگ پذیری ۲ در بافت KRAS Mutant



۱۱-۳) شکل ایمنوهِسیتوشیمی پروتئین FIH1 و بیان قوی FIH1 در گروه غیر موتانت a، b)

و بیان ضعیف در گروه موتانت c، d)

۹-۳) نتایج و جداول آنالیز آماری

در این مطالعه ۹۹ نمونه مبتلا به آدنو کارسینوم کولون از لحاظ شیوع موتاسیون در کدون ۱۲، ۱۳ و ۶۱ ژن KRAS با استفاده از متد پایروسکوئسنسینگ بررسی شد .

درصد فراوانی زنان و مردان به ترتیب ۴۴,۴٪ و ۵۵,۶٪ بود (جدول ۳-۱)

از مجموع ۹۹ بیمار ۶۱,۶٪ بیماران فاقد موتاسیون و ۳۸,۴٪ واجد موتاسیون در این ژن بودند. (جدول ۳-۲)
حدود ۸۹,۴٪ موتاسیون در کدون ۱۲ و شایع ترین موتاسیون G12D یعنی جایگزینی اسید آمینه گلیسین با آسپاراتیک اسید بود. از سوی دیگر جایگزینی اسید آمینه گلیسین با والین (G12V) با شیوع ۱۸,۴٪ در رتبه دوم قرار داشت و کم ترین شیوع موتاسیون مربوط به جایگزینی گلیسین با آلانین (G12A) بود.
شیوع موتاسیون کدون ۱۳ حدود ۱۰,۶٪ کل موارد بود و هیچ موتاسیونی در کدون ۶۱ مشاهده نشد.
(جدول ۳-۸)

این تومور در مردان با شیوع بیشتری نسبت به زنان وجود داشت و متوسط سن ۵۷ سال بود. (جدول ۳-۷)
اکثر بیماران در stage 3 بیماری قرار داشتند و کمتر از ۲۰٪ موارد وارد فاز متاستاتیک شده بودند حدود ۴۵٪ از بیماران با stage 3 بیماری واجد موتاسیون ژن KRAS بودند. (جدول ۳-۴)
حدود ۵۶٪ بیماران واجد موتاسیون KRAS از لحاظ درجه تمایز تومور Well diferenciatiated بودند.
(جدول ۳-۳)

بیش از نیمی از تومورها در کولون راست واقع شده بودند و در ۵۰٪ آن ها موتاسیون KRAS وجود داشت اما ارتباط معنی داری بین توده های کولون چپ و راست با موتاسیون KRAS دیده نشد. $P=0.3$ (جدول ۳-۶، ۹)
بین هیچ یک از پارامترهای سن ، جنس، محل توده در روده ،درجه تمایز تومور و،درجه پیشرفت تومور با موتاسیون KRAS اختلاف معنی دار آماری وجود نداشت. $P>0.05$

در بیش از یک سوم نمونه ها تهاجم عروقی تومور وجود داشت. (جدول ۳-۶)

درصد فراوانی درجه تمایزسلول های توموری (Tumor Grade) برای گروه KRAS Mutant & KRAS wild در سه درجه طبقه بندی شده از درجه تمایز بیشتر به تمایز کمتر وارتباط بین موتاسیون و درجه تمایز تومور بررسی شد آزمون آماری ارتباط معنی داری بین وضعیت موتاسیون و درجه تمایز سلول های توموری نشان نداد. $P\text{-value}=0.261$ (جدول ۳-۱۰)

همچنین درصد فراوانی مرحله پیشرفت سلول های توموری (Tumor Stage) در چهار مرحله طبقه بندی شده از پیشرفت کم به پیشرفت زیاد نشان داد بیشترین نمونه در هر دو گروه در stage 3 قرار دارند اما آزمون آماری ارتباط معنی داری بین وضعیت موتاسیون و درجه پیشرفت سلول های توموری نشان نداد. (جدول ۳-۱۱)

وضعیت یافته ها نشان داد نیمی از تومورهای KRAS Mutant تهاجم عروقی سلول های توموری (Vascular Invasion) دارند و آزمون آماری ارتباط معنی داری بین وضعیت موتاسیون KRAS و تهاجم عروقی سلول های توموری نشان داد. $P\text{-value}=0.04$ (جدول ۳-۱۲)

بررسی ارتباط بین نوع ژنوتیپ موتانت ژن KRAS در کدون های ۱۲، ۱۳ فراوانی آن در گروه مردان و زنان ، آزمون آماری ارتباط معنی داری بین نوع موتاسیون و جنسیت بیمار نشان نداد، هیچ یک از ۹۹ بیمار مورد بررسی در کدون ۶۱ موتاسیون دیده نشد. (جدول ۳-۱۳)

در این مطالعه که به منظور بررسی میزان بیان پروتئین FIH1 به روش IHC به تفکیک در تومورهای مرحله (Stage 1-4) آزمون آماری انجام شد و تنها در Stage 4 آزمون آماری اختلاف معنی داری را بین میزان بیان و مرحله پیشرفت بیماری را در دو گروه موتانت و غیر موتانت نشان داد.

همچنین بررسی میزان بیان mRNA ژن SOCS3 به تفکیک در تومورهای مرحله (Stage 1-4) آزمون آماری انجام شد و بین هیچ یک از Stage ها بایان ژن دردو گروه اختلاف معنی دار دیده نشد، این امر در مورد میزان بیان mRNA ژن FIH1 در مراحل پیشرفت از تومور نیز حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار در دو گروه بود. (جداول ۳-۱۴ الی ۱۷)

همچنین به منظور ارزیابی ارتباط بین بیان mRNA ژن های SOCS3 و FIH1 با درجه تمایز تومور در سه گرید نیز آزمون آماری اختلاف معنی داری را بین دو گروه نشان نداد اما بررسی میزان بیان ژن FIH1 به روش ایمنوهیستوشیمی در گرید دو بیماری در گروه موتانت معنی دار بود و کاهش نشان داد. (جدول ۳-۱۸ الی ۲۰)

در این تحقیق ارتباط بیان دو ژن SOCS3,FIH1 با تهاجم عروقی در نمونه های دارا تهاجم عروقی و فاقد تهاجم عروقی بررسی شد بین پروتئین بافتی FIH1 ، میزان بیان mRNA ژن SOCS3 و میزان بیان mRNA ژن FIH1 با موتاسیون KRAS اختلاف معنی داری وجود نداشت. (جدول ۳-۲۱، ۲۲)

میزان بیان پروتئین FIH1 به روش IHC و میزان تغییرات نسبی بیان دو ژن FIH1 به تفکیک در دو گروه KRAS موتانت و غیرموتانت (وحشی) نشان داد میزان بیان پروتئین FIH1 در گروه موتانت بطور معنی داری نسبت به گروه غیرموتانت کاهش دارد. (جدول ۳-۲۳)

آزمون آماری همبستگی بین مقادیر بیان FIH1 در دو سطح mRNA و پروتئین (IHC) در دو گروه KRAS موتانت و غیر موتانت ارتباط معنی داری نشان نداد. (جدول ۳-۲۴)

اما مجموع میانگین (Total Mean) بیان پروتئین بافتی FIH1 (که سلول های توموری تهاجم عروقی داشتند) به تفکیک در گروه KRAS موتانت کمتر از گروه غیر موتانت بود و میانگین میزان بیان mRNA ژن FIH1 در گروه KRAS موتانت (که تهاجم عروقی سلول های توموری داشتند) کمتر از گروه غیرموتانت بود به بیان دیگر بدون در نظر گرفتن موتاسیون KRAS در نگاه کلی مجموع میانگین بیان پروتئین بافتی FIH1 و mRNA ژن SOCS3 در افرادی که تهاجم عروقی داشتند کمتر از افرادی بود که تومورشان تهاجم عروقی نداشت.

در مجموع و بدون در نظر گرفتن شاخص های کلینیکوپاتولوژیک مانند مرحله پیشرفت تومور ، درجه تمایز تومور و تهاجم عروقی تومور ، تنها بیان پروتئین بافتی ژن FIH1 به روش ایمنوهیستوشیمی در Stage 4 و Grade 2 در گروه KRAS موتانت کاهش معنی دار نشان داد، اما همچنان بیان mRNA ژن FIH1 و ژن SOCS3 در این دو گروه معنی دار نبود .

بررسی بیشتر جزئیات نتایج آماری مراحل پیشرفت تومور (stage) و بیان پروتئین بافتی FIH1 نشان داد، مجموع میانگین بیان FIH1 در گروه KRAS موتانت کمتر از گروه غیرموتانت است به طوری که در گروه موتانت در هر مرحله از پیشرفت تومور (کم به زیاد) میزان بیان FIH1 روند کاهشی منظمی داشت و با پیشرفت بدخیمی و بالارفتن احتمال موتاسیون KRAS در بافت تومور بیان FIH1 نیز کاهش داشت. اگرچه به طور کلی تهاجم عروقی در نمونه های KRAS موتانت بیشتر از نمونه های غیر موتانت بود اما میزان بیان هیچ یک از دو ژن FIH1،SOCS3 به هر دو روش Real Time PCR و ایمنوهیستوشیمی با تهاجم عروقی ارتباط نداشت.

میانگین شدت رنگ پذیری ۲ (Intensity) و میانگین سلول های رنگ پذیر ۸۰٪ درصد بود. میانگین اسکور بیان در طیف ۰-۳۰۰ برابر ۲۰۸ بود.

این پروتئین در اجزای غیر اپیتلیالی سلول بیان واضحی داشت و بیان این پروتئین در استرومای تومور، عروق و سلول های ارتشاحی التهابی به ترتیب ۷۸٪، ۸۱٪ و ۷۴٪ مثبت بود.

جداول ذیل توزیع فراوانی صفات مورد بررسی را نشان می دهد

۱-۳) جدول توزیع فراوانی جنسیت افراد مورد مطالعه

فراوانی	درصد	
۴۴	۴۴/۴٪	مونث
۵۵	۵۵/۶٪	مذکر
۹۹	۱۰۰٪	جمع

۲-۳) جدول توزیع فراوانی شیوع موتاسیون ژن KRAS

فراوانی	درصد	
۶۱	۶۶/۱٪	غیر موتانت (وحشی)
38	۳۸/۴٪	موتانت
99	100٪	جمع

۳-۳) جدول توزیع فراوانی درجه تمایزسلول های تومور مورد مطالعه

درصد	فراوانی	
۵۵/۶٪	۵۵	درجه تمایز خوب
۳۵/۴٪	۳۵	درجه تمایز متوسط
۹/۱٪	۹	درجه تمایز ضعیف
۱۰۰٪	۹۹	جمع

۴-۳) جدول توزیع فراوانی مرحله پیشرفت تومور (Stage) تومور

درصد	فراوانی	
۸/۱٪	۸	مرحله پیشرفت تومور ۱
۳۰/۳٪	۳۰	مرحله پیشرفت تومور ۲
۴۳/۴٪	۴۳	مرحله پیشرفت تومور ۳
۱۸/۲٪	۱۸	مرحله پیشرفت تومور ۴
۱۰۰٪	۹۹	جمع

۳-۵) جدول توزیع فراوانی محل تومور آدنوکارسینوم در افراد مورد مطالعه

فراوانی	درصد	
تومور روده راست	۵۷	۵۷/۶٪
تومور روده چپ	۴۲	۴۲/۴٪
جمع	۹۹	۱۰۰٪

۳-۶) جدول توزیع فراوانی تهاجم عروقی تومور آدنوکارسینوم مورد مطالعه

فراوانی	درصد	
تهاجم عروقی دیده نشد	۶۲	۶۲/۶٪
تهاجم عروقی دیده شد	۳۷	۳۷/۴٪
جمع	۹۹	۱۰۰٪

جدول توزیع فراوانی سن افراد مورد مطالعه (۷-۳)

N	Mean±SD	
۹۹	۵۷±۱۴/۱	سن بیماران

جدول توزیع فراوانی انواع موتاسیون ژن KRAS (۸-۳)

درصد	فراوانی	
۲٪	۲	گلیسین ۱۲ آلانین
۱۵/۲٪	۱۵	گلیسین ۱۲ آسپارژین
۵/۱٪	۵	گلیسین ۱۲ سیستئین
۵/۱٪	۵	گلیسین ۱۲ سرین
۷/۱٪	۷	گلیسین ۱۲ والین
٪۴	۴	گلیسین ۱۳ آسپارژین
	۳۸	جمع

۹-۳) جدول توزیع فراوانی محل تومور آدنوکارسینوم مورد مطالعه در دو گروه KRAS

جمع نمونه	موقعیت KRAS		محل
	وحشی	موتانت	
۴۲	۲۹ (٪۴۷/۵۴)	۱۳ (٪۳۴/۲۱)	چپ
۵۷	۳۲ (٪۵۲/۴۵)	۲۵ (٪۶۵/۷۱)	راست
۹۹	۶۱ (٪۱۰۰)	۳۸ (٪۱۰۰)	جمع

جدول توزیع فراوانی درجه تمایز تومور آدنوکارسینوم کولون (۱۰-۳)

		Tumor grade			Total
		1	2	3	
KRAS Status	Wild	30 (49.2%)	25 (41.0%)	6 (9.8%)	61
	Mutant	25 (65.8%)	10 (26.3%)	3 (7.9%)	38
Total		55 (55.6%)	35 (35.4%)	9 (9.1%)	99

Chi-square test was used (P-value = 0.261)

جدول توزیع فراوانی مراحل پیشرفت تومور (Stage) آدنوکارسینوم کولون (۱۱-۳)

		Tumor stage				Total
		1	2	3	4	
KRAS Status	Wild	5(8.2%)	20(32.8%)	26(42.6%)	10(16.4%)	61
	Mutant	3(7.9%)	10(26.3%)	17(44.7%)	8(21.1%)	38
Total		8(8.1%)	30(30.3%)	43(43.4%)	18(18.2%)	99

Chi-square used (P-value=0.890)

جدول توزیع فراوانی تهاجم عروقی در تومور آدنوکارسینوم در دو گروه KRAS (۱۲-۳)

KRAS.status	vascular.invasion		Total
	NOT	seen	
wild	43(70.5%)	18(29.5%)	61(100%)
Mutant	19(50.0%)	19(50.0%)	38(100%)
Total	62(62.6%)	37(37.4%)	99(100%)

Chi-square used(P-value=0.040)

جدول توزیع فراوانی انواع موتاسیون ژن KRAS و جنسیت

بیماران

Mutation	sex		Total
	Female	Male	
gly12Ala	1(5.6%)	1(5.0%)	2(5.3%)
gly12Asp	6(33.3%)	9(45.0%)	15(39.5%)
gly12CYS	1(5.6%)	1(5.0%)	2(5.3%)
gly12Cys	0(0%)	3(15.0%)	3(97.9%)
gly12ser	2(11.1%)	3(15.0%)	5(13.2%)
gly12val	5(27.8%)	2(10.0%)	7(18.4%)
gly13Asp	3(16.7%)	1(5.0%)	4(10.5%)
Total	18(100.0%)	20(100.0%)	38(100.0%)

Chi-square used (P-value=۰.424)

۳-۱۴) جدول میزان بیان پروتئین FIH1 به روش ایمنوهیستوشیمی و بیان mRNA دو ژن FIH1 و SOCS3 در دو گروه موتانت و غیر موتانت به تفکیک در تومور مرحله (Stage 1)

	KRAS.status	N	Mean±SD	P-value
FIH1 Immunohistochemistry	wild	5	1.57 ± 78	0.5
	Mutant	3	1.96 ± 98	
Fold.Change. SOCS3	wild	5	0.43 ± 0.25	0.3
	Mutant	3	0.27 ± 0.04	
Fold.Change.FIH1	wild	5	0.25 ± 0.42	0.4
	Mutant	3	0.02 ± 0.01	

Tumor stage= 1, T- test or Mann-Whitney U test were used

۳-۱۵) جدول میزان بیان پروتئین FIH1 به روش ایمنوهیستوشیمی و بیان mRNA دو ژن FIH1 و SOCS3 در دو گروه موتانت و غیر موتانت به تفکیک در تومور مرحله (Stage 2)

	KRAS.status	N	Mean±SD	P-value
FIH1 Immunohistochemistry	wild	20	1.55±82	0.83
	Mutant	10	1.49±59	
Fold.Change. SOCS3	wild	20	0.60±0.32	0.85
	Mutant	10	0.60±0.63	
Fold.Change.FIH1	wild	19	0.19±0.23	0.87
	Mutant	10	0.15±0.18	

Tumor.stage = 2 T- test & Mann-Whitney U test used

۱۶-۳) جدول میزان بیان پروتئین FIH1 به روش ایمنوهیستوشیمی و بیان mRNA دو ژن FIH1 و SOCS3 در دو گروه موتانت و غیر موتانت به تفکیک در تومور مرحله (Stage 3)

	KRAS.status	N	Mean±SD	P-value
FIH1 Immunohistochemistry	wild	26	1.51±71	0.07
	Mutant	17	1.11±66	
Fold.Change. SOCS3	wild	26	0.47±0.37	0.8
	Mutant	17	0.50±0.44	
Fold.Change.FIH1	wild	26	0.13±0.14	0.1
	Mutant	17	0.21±0.24	

Tumor.stage = 3 T- test & Mann-Whitney U test used

۱۷-۳) جدول میزان بیان پروتئین FIH1 به روش ایمنوهیستوشیمی و بیان mRNA دو ژن FIH1 و SOCS3 در دو گروه موتانت و غیر موتانت در تومور مرحله (Stage 4)

	KRAS.status	N	Mean±SD	P-value
FIH1 Immunohistochemistry	wild	10	1.99±85	0.04
	Mutant	8	1.15±73	
Fold.Change. SOCS3	wild	10	0.32±0.26	0.4
	Mutant	6	0.24±0.05	
Fold.Change.FIH1	wild	10	0.15±0.17	0.7
	Mutant	6	0.13±0.16	

Tumor.stage = 4. T- test & Mann-Whitney U test used

۱۸-۳) جدول میزان بیان پروتئین FIH1 به روش ایمنوهیستوشیمی و بیان mRNA دو ژن FIH1 و SOCS3 در دو گروه موتانت و غیر موتانت در تومور های با درجه تمایز خوب (grade1)

	KRAS.status	N	Mean±SD	P-value
FIH1 Immunohistochemistry	wild	30	1.51±71	0.5
	Mutant	25	1.40±65	
Fold.Change. SOCS3	wild	30	0.56±0.33	0.1
	Mutant	23	0.41±0.41	
Fold.Change.FIH1	wild	29	0.14±0.19	0.7
	Mutant	23	0.13±0.17	

T- test & Mann-Whitney U test used tumor grade =1

۱۹-۳) جدول میزان بیان پروتئین FIH1 به روش ایمنوهیستوشیمی و بیان mRNA دو ژن FIH1 و SOCS3 در دو گروه موتانت و غیر موتانت در تومور های با درجه تمایز متوسط (grade 2)

	KRAS.status	N	Mean±SD	P-value
FIH1 Immunohistochemistry	wild	25	1.84±84	0.05
	Mutant	10	1.20±84	
Fold.Change. SOCS3	wild	25	0.39±0.32	0.1
	Mutant	10	0.58±0.52	
Fold.Change.FIH1	wild	25	0.14±0.15	0.08
	Mutant	10	0.27±0.24	

T- test & Mann-Whitney U test used tumor grade =2

۳-۲۰) جدول میزان بیان پروتئین FIH1 به روش ایمنوهیستوشیمی و بیان mRNA دو ژن FIH1 و SOCS3 در دو گروه موتانت و غیر موتانت در تومور های با درجه تمایز ضعیف (grade3)

	KRAS.status	N	Mean±SD	P-value
FIH1 Immunohistochemistry	wild	6	1.13±53	0.19
	Mutant	3	66.3±23	
Fold.Change. SOCS3	wild	6	0.54±0.37	0.7
	Mutant	3	0.63±0.54	
Fold.Change.FIH1	wild	6	0.33±0.36	0.6
	Mutant	3	0.21±0.16	

T- test & Mann-Whitney U test used tumor grade =3

۲۱-۳) جدول میزان بیان پروتئین FIH1 به روش ایمنوهیستوشیمی و بیان mRNA دو ژن FIH1 و SOCS3 در دو گروه موتانت و غیر موتانت که در تهاجم عروقی توموری نداشتند

	KRAS.status	N	Mean±SD	P-value
FIH1 Immunohistochemistry	wild	43	1.71±78	0.2
	Mutant	19	1.43±70	
Fold.Change. SOCS3	wild	43	0.55±0.35	0.7
	Mutant	19	0.52±0.50	
Fold.Change.FIH1	wild	43	0.15±0.20	0.7
	Mutant	19	0.17±0.21	

T- test & Mann-Whitney U test used vascular.invasion = NOT

۲۲-۳) جدول میزان بیان پروتئین FIH1 به روش ایمنوهیستوشیمی و بیان mRNA دو ژن FIH1 و SOCS3 در دو گروه موتانت و غیر موتانت که در تهاجم عروقی توموری داشتند

	KRAS.status	N	Mean±SD	P-value
FIH1 Immunohistochemistry	wild	18	1.36±73	0.2
	Mutant	19	1.10±67	
Fold.Change. SOCS3	wild	18	0.34±0.23	0.4
	Mutant	17	0.43±0.40	
Fold.Change.FIH1	wild	17	0.19±0.22	0.8
	Mutant	17	0.17±0.19	

T- test & Mann-Whitney U test used vascular.invasion = Seen

۲۳-۳) جدول میزان بیان پروتئین FIH1 به روش IHC و میزان تغییرات نسبی بیان دو ژن FIH1 به تفکیک در دو گروه KRAS موتانت و غیرموتانت (وحشی)

	KRAS.status	N	Mean±SD	P-value
FIH1 Immunohistochemistry	wild	61	161.09 ± 9.96	0.043
	Mutant	38	129.29 ± 11.45	
Fold.Change.FIH1	wild	60	0.168±.03	0.71
	Mutant	36	0.178±.03	

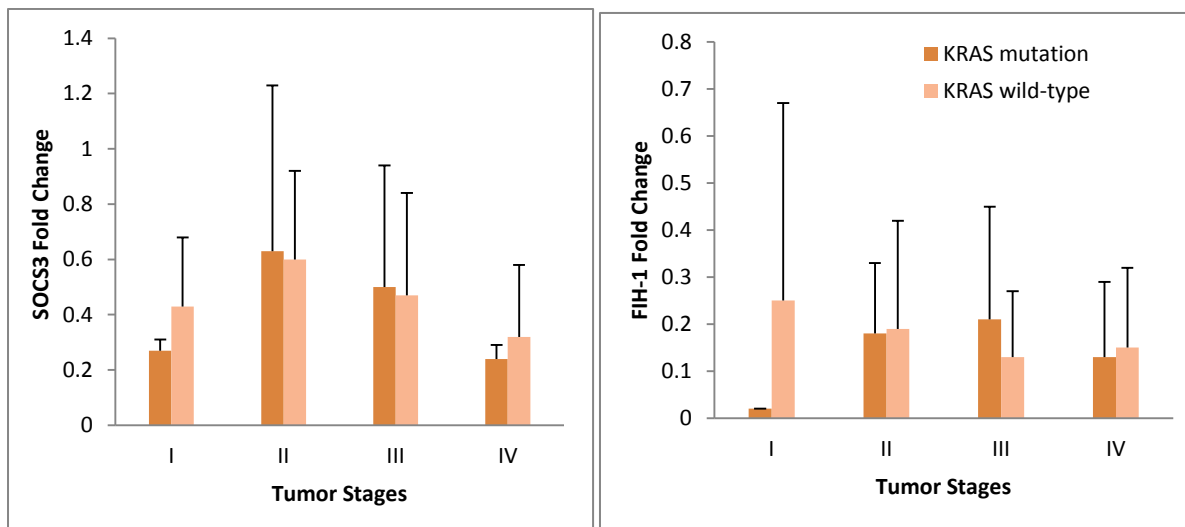
Independent T- test & Mann-Whitney U test used.

۲۴-۳) جدول آزمون آماری همبستگی بین مقادیر بیان FIH1 در دو سطح mRNA و پروتئین (IHC) در دو گروه KRAS موتانت و غیر موتانت

	KRAS Status	Correlation of Coefficient	P-Value
Correlation Coefficient between IHC Score and Fold Change FIH1	Wild	0.19	0.15
Correlation Coefficient between IHC Score and Fold Change FIH1	Mutant	0.18	0.28

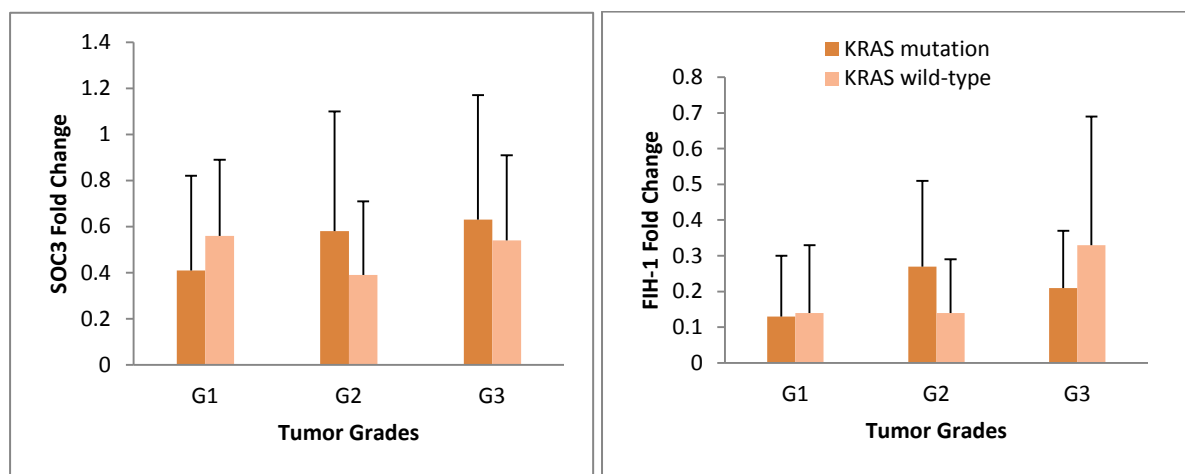
Spearman Correlation Coefficient

نمودار بیان *SOCS3* و *FIH1* در دو گروه موتانت و غیر موتانت وعدم ارتباط آن ها با مرحله تومور



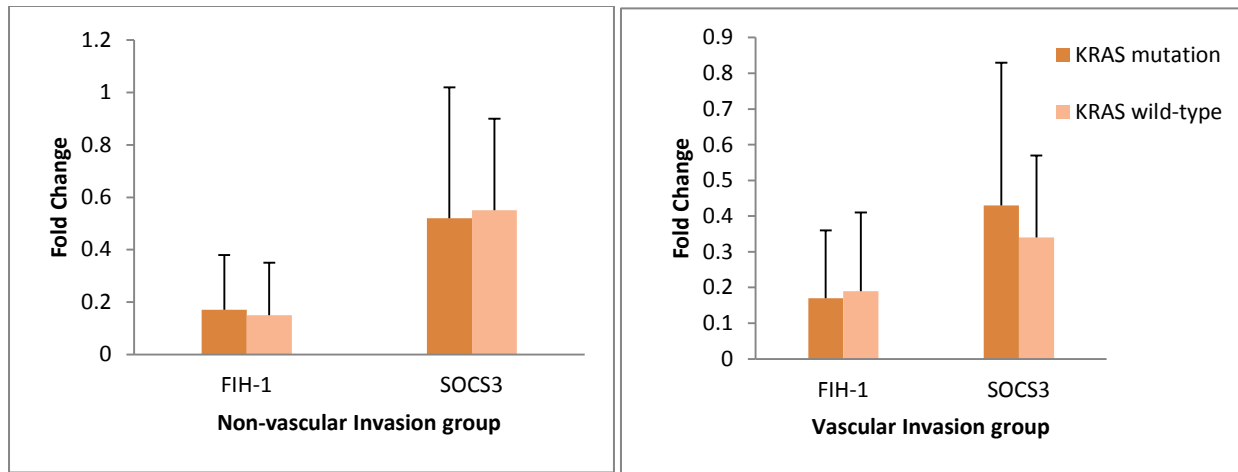
۱۱-۳ شکل بیان *SOCS3* و *FIH1* در دو گروه موتانت و غیر موتانت وعدم ارتباط آن ها با مرحله تومور

نمودار بیان *SOCS3* و *FIH1* در دو گروه موتانت و غیر موتانت وعدم ارتباط آن ها با تمایز تومور



۱۲-۳ شکل بیان *SOCS3* و *FIH1* در دو گروه موتانت و غیر موتانت وعدم ارتباط آن ها با تمایز تومور

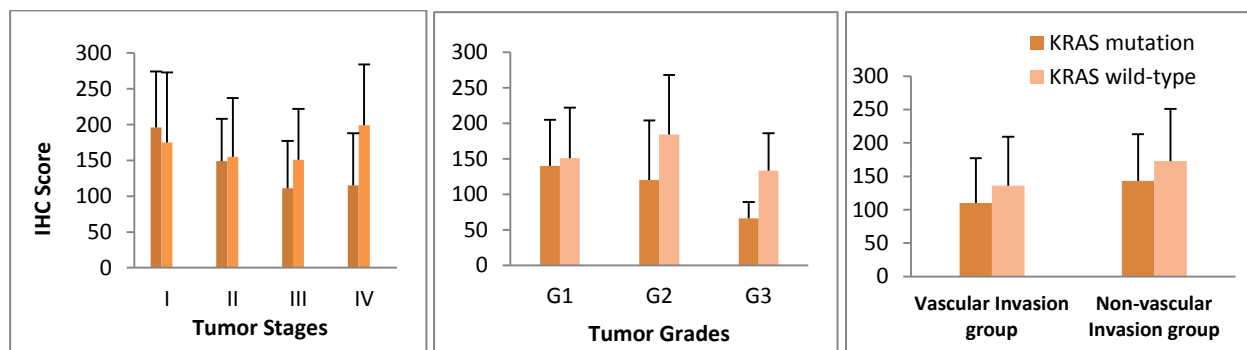
نمودار بیان FIH1 و SOCS3 در دو گروه و عدم ارتباط آن ها با تهاجم عروقی



۱۳-۳ شکل نمودار بیان FIH1 و SOCS3 در دو گروه و عدم ارتباط آن ها با تهاجم عروقی

نمودار بیان پروتئین FIH1 در دو گروه موتانت و غیر موتانت به روش ایمنوهیستوشیمی و ارتباط آن با مرحله

پیشرفت، تمایز و تهاجم عروقی



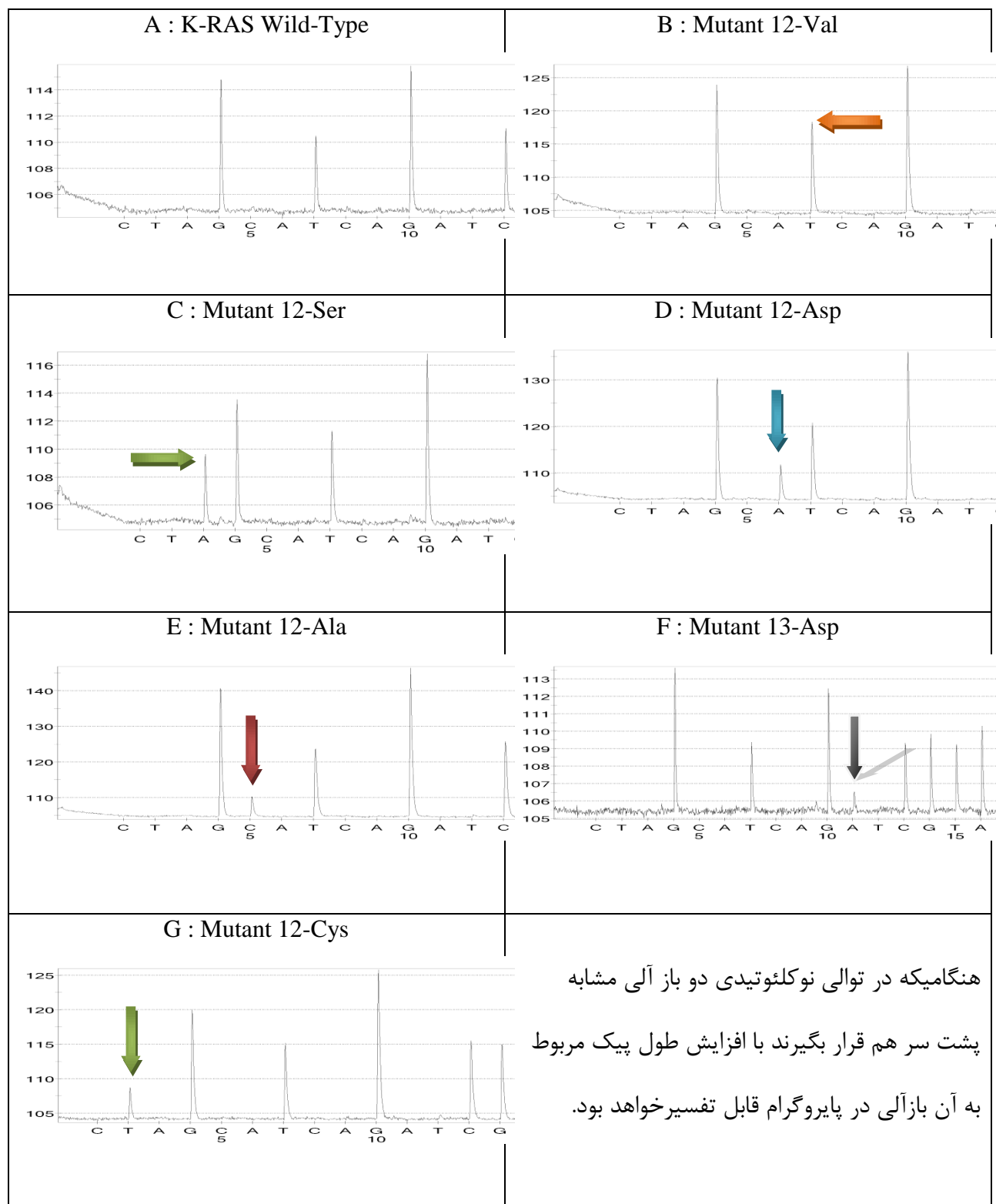
۱۴-۳ شکل بیان پروتئین FIH1 در دو گروه موتانت و غیر موتانت به روش ایمنوهیستوشیمی و ارتباط آن با

مرحله پیشرفت (a) تمایز (b) و تهاجم عروقی (c)

در این تحقیق آگزون های دوم و سوم ژن KRAS شامل کدون های ۱۲، ۱۳ و ۶۱ مورد بررسی قرار گرفت . شیوع جهش در کدون ۱۲ بیشتر از ۱۳ بود و در کدون ۶۱ هیچ جهشی دیده نشد. بیشترین نوع موتاسیون در دو کدون ۱۲ و ۱۳ تبدیل اسید آمینه گلايسين به اسيد آمينه آسپاراتات بود. پايروگرام انواع موتاسيون های نقطه ای و نمای پايروگرام ژن KRAS غير موتانت به همراه جدول جایگزینی های نوکلئوتیدی و اسید آمینه مربوطه آن را مشاهده می کنید.

جدول ۳-۲۵) جایگزینی های نوکلئوتیدی و اسید آمینه مربوطه آن

A: Exon2 & Exon 3 Normal Genotype			GGC /CAA /GGT		
B: G12V G>T Val			C: G12S G>A Ser		
D: G12D G>A Asp			E: G12A G>C Ala		
F: G13D G>A Asp			G: G12C G>T Cys		
H: G12R G>C Arg					



۱۵-۳ شکل نمای پایروگرام ژن KRAS چند بیمار

فصل چہارم

بحث

ماهیت ناهمگون (هتروژن) آدنوکارسینومای کولورکتال (CRC) و پاسخ ناموفق به درمان با آنتی بادی های مهار کننده گیرنده سلولی در این تومور ، لزوم تشخیص و طبقه بندی مولکولی این بیماری را برطبق شاخص های مهم مانند KRAS، BRAF، MSI را توجیه می کند. امروزه در کانسرکولون موتاسیون KRAS به عنوان نشانگر زیستی (مارکر) پیش آگهی دهنده بیماری محسوب می شود. (۳۵، ۶۶)

در تومورکولون ، پدیده کاهش فشار اکسیژن (هیپوکسی) و همچنین موتاسیون ژن KRAS ، موجب مقاومت اکتسابی به درمان، رفتار تهاجمی تومور و کاهش طول عمر می شود و از طرفی دیگر، شرایط هیپوکسی و موتاسیون ژن KRAS موجب تشدید اثر یکدیگر می شوند. (۶۷)

ارتباط بین انکوژن KRAS با افزایش بیان و عملکرد فاکتور $HIF1\alpha$ در تشدید رگ زایی (آنژیوژنز) در آدنوکارسینومای کولون، و همچنین پیش آگهی ضعیف در این بیماران تایید شده است. (۶۸)

امروزه مهار هیپوکسی و پروتئین های مرتبط با آن از هدف های نوین درمانی سرطان به شمار می آیند. بنابراین میزان بیان تنظیم کننده های مسیر آنژیوژنز مانند پرولیل هیدروکسیلازها و آسپاراژیل هیدروکسیلازها از جمله FIH_1 (Factor inhibiting HIF-1) در بافت های سرطانی اهمیت بسیاری دارد.

ملکول $SOCS3$ ، مهارکننده و تنظیم گر مسیر JAK/STAT ، از طریق اتصال به GAP-RAS(GTPase) با مسیر RAS (مسیر مرتبط با هیپوکسی) ارتباط دارد و بررسی میزان بیان آن در CRC اهمیت دارد. (۵۰)

لذا در این پروژه میزان بیان مولکول $SOCS3$ و فاکتور FIH_1 (مهار کننده $HIF1\alpha$) در تومورهای آدنوکارسینومای کولون ، واجد و فاقد موتاسیون (درسه کدون ۱۲، ۱۳ و ۶۱) ژن KRAS ، بر روی ۹۹ نمونه پارانینه مورد مطالعه قرارگرفت.

همچنین ارتباط موتاسیون KRAS با شاخص های آسیب شناسی بالینی مانند درجه پیشرفت تومور (Stage)، درجه تمایز تومور (Grade) و تهاجم عروقی (Vascular Invasion) نیز بررسی شدند.

امروزه به لحاظ سهولت در روش کار و تفسیر نتایج نهایی، توالی یابی به روش پایروسکوئسنسینگ رواج بیشتری پیدا کرده است. همچنین یکسری قابلیت های منحصر بفرد در این روش مانند، بررسی متیلاسیون DNA از دیگر ویژگی های خاص این متد است.

آنالیز موتاسیون ژن KRAS به دو روش سانجرسکوئسنسینگ و پایروسکوئسنسینگ در بیماران کولورکتال کانسر و سرطان سلول های بزرگ ریه (NCLC) نشان داده است که روش پایروسکوئسنسینگ منفی کاذب و مثبت کاذب ندارد و از میان بیش از صد نمونه مورد آزمایش تنها دو نمونه گراف پایروگرام مربوط به پایروسکوئسنسینگ قابل تفسیر نبود در حالی که روش سانجر به ترتیب ۶,۱٪ و ۱۱,۱٪ نتایج، منفی کاذب و مثبت کاذب بودند. (۳)

چنانچه کمتر از ۵٪ توده های سرطانی شامل KRAS موتانت باشد را می تواند روش پایروسکوئسنسینگ می تواند موتاسیون را تشخیص دهد، در حالی که در روش سانجر (sanger) حداقل باید بیش از ۲۵٪ میزان توده سرطانی موتاسیون داشته باشد، روش پایروسکوئسنسینگ یکی از روش های بررسی انواع واریانت های موتاسیون KRAS در نمونه های فیکس شده با فرمالین (FFPE) است که می تواند انواع واریانت های موتانت ژن KRAS را در حداقل توده سرطانی آشکار کند در متد پایروسکوئسنسینگ می توان با میزان DNA کمتر از ۱۰ نانوگرم، آنالیز KRAS را بر روی نمونه های بیوپسی و بلوک های پارافینه با حساسیت بسیار بالا انجام داد. (۶۹-۷۱)

مقاله مروری دکتر مصطفی رونقی (مبدع روش) مزایای روش پایروسکوئسنسینگ را به لحاظ تفاوت در استراتژی، نوع دستگاه و آنزیم پلیمریزاسیون، آن را در باز خوانی توالی، توالی یابی های جدید و ژنوتایپینگ انواع میکروارگانسیم ها مناسب و به صرفه دانسته است.

بر طبق مطالعات، آنالیز KRAS به روش پایروسکوئسنسینگ در انتخاب اول روش های Personalized Cancer Treatment قرار دارد. (۶۵)

در مطالعه ما به روش پایروسکوئسنسینگ، از مجموع ۹۹ نمونه آدنوکارسینوم کولون، ۶۱,۶٪ آن ها فاقد جهش ژن KRAS و ۳۸,۴٪ موارد جهش (موتانت) داشت این میزان شیوع موتاسیون (۳۸,۴٪) با مطالعه قبلی در سال ۲۰۰۶ تقریباً یکسان بود (۳۷,۴٪). (۷۲)

فراوانی موتاسیون ژن KRAS در اگزون شماره یک و در کدون ۱۲ بیشتر از کدون ۱۳ بود و در هیچ یک از نمونه ها در کدون ۶۱ موتاسیونی دیده نشد .

مشابه مطالعات قبلی ، جایگزینی نوکلئوتید گوانین با آدنین در تبدیل اسیدآمینه گلیسین به آسپاراتات (G12D) شایع ترین نوع موتاسیون نقطه ای در نمونه های بافت آدنوکارسینوم کولون بود (۷۲) ، همچنین مشابه گزارش کودکان و همکاران، در مطالعه ما نیز این تومور در مردان نسبت به زنان شیوع بیشتری داشت. (۷۳) متوسط سن بیماران ۵۷ سال بود که نشان دهنده اثر تغییر روش سبک زندگی و نوع تغذیه بر احتمال بروز سرطان در این سنین پایین تر است.

بیش از نیمی از موارد تومورهای KRAS موتانت در روده راست قرار داشت اما ارتباط معنی داری بین موتاسیون ژن KRAS با درجه پیشرفت تومور Stage، درجه تمایز تومور، (Grade) جنس، سن ، محل تومور ، متاستاز گره لنفی و اندازه تومور دیده نشد ، این یافته ها با نتایج مطالعه گسترده ای که بر روی ۱۱۱۰ بیمار CRC در کشور چین انجام شده بود مشابه بود ، در مطالعه فوق نیز بین موتاسیون KRAS با سن ، جنس ، تعداد گره لنفی ، عمق تومور و مرحله و درجه تمایز تومور ارتباط معنی دار دیده نشده بود. (۷۳-۷۵)

نکته قابل توجه این است که در مشاهدات ما بین موتاسیون ژن KRAS با تهاجم عروقی تومور ارتباط معنی دار آماری وجود داشت ، به طوری که تهاجم عروقی در ۳۷,۴٪ کل بیماران و نیمی از تومورهای KRAS موتانت دیده شد که با نتایج مطالعه کودکان و هماهنگ نبود. (۷۳)

در گام بعدی ، ارتباط میان SOCS3، FIH1 با شاخص های آسیب شناسی سرطان مورد بررسی قرار گرفت. در این خصوص چندین گزارش مبنی بر تغییر الگوی بیان این دو ژن در تومور CRC وجود دارد (۷۶-۷۹) ، هدف ما استفاده از تغییر الگوی بیان این ژن ها به عنوان مارکر پیش آگهی دهنده و امکان طبقه بندی مولکولی CRC بود.

اما از آن جا که اختلاف معنی داری میان الگوی بیان mRNA دو ژن SOCS3 و FIH1 با مراحل پیشرفت تومور (Stage)، درجات تمایز تومور (Grade) و تهاجم عروقی وجود نداشت لذا به نظر می رسد که بررسی الگوی

بیان این دو ژن روش مناسبی برای طبقه بندی تومور بر پارامترهای پاتولوژیک نیست واز این طریق نمی توان پارامترهای آسیب شناسی تومور را پیش بینی کرد.

در تومورهای دارای تهاجم عروقی ، میانگین بیان mRNA FIH1 در گروه KRAS موتانت به طور منظم و باشیب ملایم کاهش داشت که می تواند حاکی از اثر موتاسیون ژن KRAS بر بیان این ژن FIH1 و فرآیند (آنژیوژنیزیس) باشد ، این با تحقیقاتی که در آن موتاسیون KRAS موجب افزایش فاکتورهای رشد اندوتلیال عروق ورگ زایی می شود نیز قابل توجیه است.

بروز قوی و واضح پروتئین FIH1 در بررسی میکروسکوپی اسلایدهای ایمنوهیستوشیمی نمونه های آدنو کارسینوم کولون و بافت نرمال مجاور حاکی از آن بود که اگر چه این فاکتور از پروتئین های بنیادی و مهم سلولی است و در سلول سرطانی هم همچنان بیان می شود (۵۶) ، اما کاهش واضح و معنی دار پروتئین بافتی FIH1 در گروه KRAS موتانت ، نشان میدهد که انکوژن RAS موجب غیر فعال شدن سرکوبگرهای توموری می گردد و فاکتور FIH1 یک سرکوبگر تومور در CRC است . (۵۷, ۸۰, ۸۱)

بررسی ارتباط میزان پروتئین FIH1 با شاخص های کلینیکوپاتولوژیک جهت طبقه بندی مولکولی CRC نشان داد ، کاهش میزان پروتئین بافتی تنها در Stage4 و Grade2 بیماری در گروه KRAS موتانت وجود دارد ، بر اساس مطالعاتی که بر روی میکروارنای (miR) مهارکننده این ژن صورت گرفته ، میکروارنای مهار کننده FIH1 یا (miR-31) نیز در Stage بالا و مراحل پیشرفته CRC افزایش می یابد که با یافته ما هماهنگ است.(۷۸, ۸۲, ۸۳)

کاهش میزان بیان پروتئین FIH1 در گروه موتانت با افزایش پیشرفت مرحله تومور و کاهش تمایز تومور به لحاظ بافت شناسی (هیستولوژیک) قابل توجیه است ، چرا که در سرطان سازماندهی و عملکرد های طبیعی سلولی بهم می ریزد، به طور مثال اسکور بیان (Score) در بافت موتانت Stage 3 نصف میزان بیان در بافت Stage 1 بود .

نتایج این تحقیق مانند گزارشات قبلی، بین موتاسیون ژن KRAS با تهاجم عروقی تومور ارتباط نشان داد، اما بین بیان پروتئین FIH1 در تومورهای دارای تهاجم عروقی نسبت به تومورهای فاقد تهاجم در هر دو گروه

موتانت و غیر موتانت ارتباطی وجود نداشت. (۷۴, ۸۴, ۸۵)

به طور کلی میانگین بیان (Mean) پروتئین FIH1 در گروه KRAS موتانت (دارا و فاقد تهاجم عروقی) کاهش وجود داشت و چون نیمی از تومورهای KRAS موتانت همراه با تهاجم عروقی، در مراحل پیشرفته تومور قرار داشتند به نظر می رسد، موتاسیون ژن KRAS بر وخامت فنوتایپ تومور و بیان پروتئین FIH1 اثرگذار است زیرا ۷۰٪ از تومورهای فاقد موتاسیون ژن KRAS آنژیوژنز (تهاجم عروقی) نداشتند و متوسط بیان پروتئین FIH1 در آن ها بسیار بیشتر بود.

این شواهد اثر موتاسیون KRAS بر کاهش بیان این ژن و افزایش استعداد به تهاجم عروقی (آنژیوژنز) در این تومورها را نشان می دهد، یافته های ما با مطالعه chen که اعتقاد دارد فعالیت RAS موجب فسفریلاسیون و فعالیت HIF1 α و افزایش نسخه برداری از ژن های آنژیوژنز می گردد و مهار HIF1 α در درمان سلول های توموری روده KRAS موتانت بسیار موثرند قابل تامل است. (۸۶, ۸۷)

در گزارش هیروتوشی نیز موتاسیون ژن KRAS به طور خاص موجب افزایش و پایداری HIF1 α آن در تومور کولون شده بود. (۶۴, ۸۸)

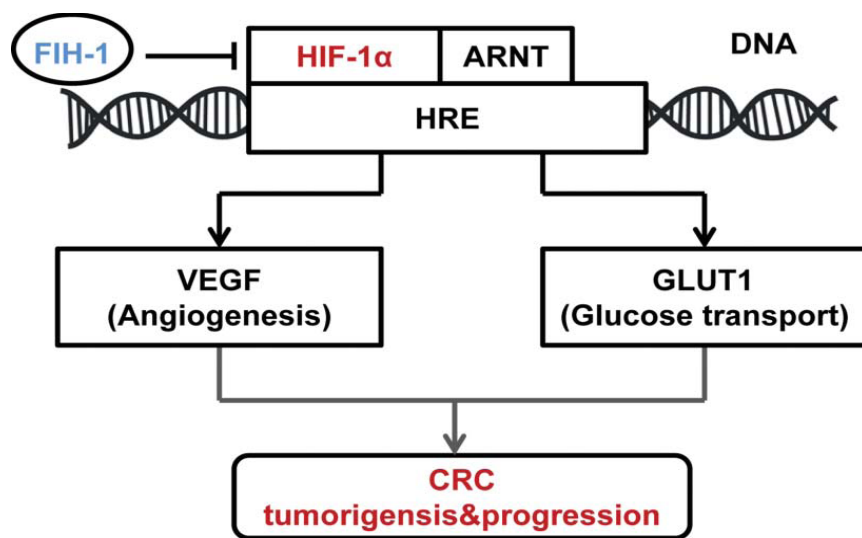
اتفاق نظر بر این است که کاهش بیان، عدم فعالیت و خروج فاکتور FIH1 از هسته سلول تومور با فنوتایپ وخیم تومور پستان و گلیو بلاستوما ارتباط دارد، تان و همکارانش در گزارش خود اذعان کرده اند در بدخیمی سرطان مهاجم پستان با درجه تمایز ضعیف، میزان هسته ای FIH1 کاهش دارد بنابراین به نظر می رسد افزایش پایداری HIF1 α در هسته در پی فعال شدن انکوژن KRAS در سلول توموری روده، علت کاهش بیان هسته ای فاکتور FIH1 در آدنو کارسینوم روده را توجیه کند.

وی معتقد است که مقدار FIH1 در هسته سلول با مهار c- ترمینال دومین (CAD) در ملکول $HIF1\alpha$ ارتباط دارد و بالا بودن آن در هسته موجب کاهش فعالیت $HIF1\alpha$ و به دنبال آن باعث کاهش یا مهار آنژیوژنز و متاستاز تومور می گردد ، بر عکس میزان سیتوپلاسمی آن با وخامت تومور و کاهش طول عمر بیمار ارتباط دارد. (۵۸)

تاکنون موتاسیون سوماتیک و جرم لاین ژن FIH1 در سرطان ها گزارش وجود ندارد اما موتاسیون نواحی اتصال FIH1 به فاکتور VHL گزارش شده است ، اتصال FIH1 به فاکتور ون هیپل لیندائو (VHL) در تشکیل کمپلکس مهارتی جهت سرکوب فیزیولوژیک فاکتور $HIF1\alpha$ ضروری است. (۵۶، ۸۹)

نقص های کروموزومی و حذف های ژنی مربوط به نواحی کدکننده این ژن موجب کاهش یا خروج این فاکتور از هسته می شود، به طور مثال حذف شایع و مهم کروموزومی در ناحیه 10q24 ، محل کدگذاری ژن مهارگر تومور PTEN ، در نزدیکی ژن FIH1 قرار دارد و تغییرات اپی ژنتیکی همراه بانقص بیان این پروتئین در تومورهای مغزی گلیو بلاستوما و سرطان پستان گزارش شده است. (90, 91)

شایان ذکر است درصد قابل توجهی از بیماران کولورکتال کانسر از لحاظ ژن PTEN دچار اختلال بوده واین مهم اثر سرکوبگری توموری ژن FIH1 را قوت می بخشد. (۹۲)



۴-۱ شکل نمودار نقش فاکتور FIH1 در کانسر کولون

مهم این است که FIH1 با هیدروکسیلاسیون $HIF1\alpha$ موجب مهار نسخه برداری از ژن های آنژیوژنز شده و مانع پیشرفت و بقای تومورهای جامد می شود، همچنین کاهش آن در بافت های نئوپلاستیک با فعالیت فاکتورهای پیشبرنده سرطان ارتباط دارد، البته این واقعیت در همه بدخیمی ها دیده نمی شود و میزان بیان پروتئین بافتی FIH1 در برخی بدخیمی ها مانند سرطان کلیه (RCC) و تومورهای اندوکراین پانکراس (PET) کاهش نداشته و حتی نسبت به بافت سالم نیز افزایش نشان داده است. (۶۰)

فرض بر این است ، در مواردی که سطح پروتئین FIH1 در بافت نئوپلاستیک کاهش نیافته، اما فعالیت هیدروکسیلازی آن بر روی $HIF1\alpha$ دچار نقص شده است، که کمبود دسترسی به منابع اکسیژن در ریز محیط و نواحی هیپوکسیک داخل تومور دلیل آن است ،چرا که این آنزیم برای فعالیت هیدروکسیلازی خود به اکسیژن وابسته است، همچنین مکانیسم های PTM یا اصلاحات پس از ترجمه بر روی FIH1 فعالیت آنزیمی آن را کاهش می دهد. (۹۳، ۹۴)

بررسی بیان FIH1 و SOCS3 به وسیله qPCR و ارتباط آن ها با شاخص های آسیب شناسی در مطالعه ما هیچ ارتباطی بین بیان این ژن ها با پارامترهای ذکر شده نشان نداد در صورتی که مقاله تائو در مطالعه خود بین بیان FIH1 با عمق و تهاجم و متاستاز تومور در تعداد نمونه مشابه با مطالعه ما ارتباط دیده است. (۹۵)

البته بین این دو مطالعه چندین تفاوت اساسی وجود دارد:

اول اینکه نمونه های مطالعه ما به صورت (FFPE) فرمالین فیکس جمع آوری شده بود، اما تائو بر روی نمونه تازه (Fresh) تحقیق کرده بود.

دوم، وی جهت بررسی بیان پروتئین از تکنیک وسترن بلاتینگ استفاده و بافت سرطانی را با بافت نرمال همجوار خود مورد بررسی قرار داده بود و بررسی موتاسیون ژن KRAS مبنای کار وی نبود، بنابراین با توجه به موارد فوق تفاوت در نتایج این دو مطالعه قابل توجیه است.

وی در مطالعه دیگری با بررسی miR-31 و مشاهده افزایش این میکروارنای تخریب کننده mRNA FIH1 علت کاهش آن در بافت تومور روده نسبت به بافت نرمال همجوار را توجیه کرد. (۹۶)

اینکه چرا در شواهد ما، کاهش بیان FIH1 در سطح پروتئین وجود داشت اما در سطح مولکولی این کاهش معنی دار نبود را می توان از چند دیدگاه مورد نقد و بررسی قرار داد:

اگرچه بیان مولکولی این ژن در دو گروه موتانت و غیر موتانت تفاوتی نداشت اما احتمالاً بیان یکسری الیگنوکلئوتیدهای تخریب گر مانند میکروارناها خصوصاً در شرایط جهش ژن KRAS با شناسایی 3' UTR mRNA ژن FIH1، مانع بیان آن و یا اصلاحات پس از ترجمه (PTM) در سلول و اعمال اصلاحاتی مانند گلیکوزیلاسیون و غیره موجب افزایش خروج این پروتئین از هسته سلول های موتانت و کاهش آن می شود. ژن SOCS3 به عنوان تنظیم گر مسیر JAK-STAT است و کاهش SOCS3 در بیماری های التهابی کولون مانند اولسراتیو کولیتیس و حتی تومورهای ناشی از این التهابات و تومورهای تک گیر دیده شده است. (۴۷، ۹۷) اما به طور خاص اثر موتاسیون KRAS بر میزان بیان این تنظیم گر در تومور روده گزارشی وجود ندارد. هامیلتون نیز با بررسی میزان بیان SOCS3 در تومور روده و مقایسه آن با بافت نرمال همجوار خود ارتباطی بین میزان بیان SOCS3 در گروه با و بدون آدنومای روده ندید، او معتقد است اگر چه این ژن در بیماران آدنومای کولون کاهش دارد اما در موکوزای روده این کاهش به تنهایی به عنوان یک بیومارکر پیش بینی کننده ریسک تبدیل آدنوما به آدنوکارسینوما نیست و کاهش قابل توجه آن در مراحل نهایی CRC دیده می شود. (۹۸) البته مطالعه اعضای مسیر RAS نشان داده است که بیان SOCS3 در سلول های NRAS موتانت نسبت به گروه غیر موتانت افزایش داشت، به نظر می رسد با توجه به نرخ پایین شیوع موتاسیون NRAS (تنها ۱٪) در تومور کولون این گزارش به بررسی بیشتری نیاز دارد، در مطالعه ما متوسط بیان در گروه موتانت دارای تهاجم عروقی قدری بیشتر از گروه غیر موتانت بود.

به نظر می رسد به دلیل اینکه بین بیان mRNA دو ژن FIH1، SOCS3 با شاخص های آسیب شناسی (کلینیکوپاتولوژیک) و موقعیت KRAS ارتباطی وجود نداشت بنابراین بررسی الگوی بیان این دو ژن برای طبقه بندی ملکولی نمونه های سرطان روده بزرگ ایده آل و قابل قبول نیست.

به طور کلی به دلیل اینکه روش های بررسی مستقیم بافت مانند ایمنوهیستوشیمی نتایج قابل اطمینان تری را در خصوص بررسی میزان پروتئین بافتی در اختیار ما قرار می دهد، به طور رایج به عنوان یک تست گلد - استاندارد جهت امور تحقیقاتی و حتی اکثر روش های تشخیص کلینیکی استفاده می شود.

امروزه ایمنوهیستوشیمی در اکثر روش های تشخیص بیومارکرهای بافتی جهت تعیین نوع و طبقه بندی مولکولی بدخیمی ها ، ارزیابی مارکرهای تعیین کننده موفقیت در پاسخ به درمان تومورها و امکان ارزیابی الگوی توزیع بافتی پروتئین ، به طور گسترده مورد استفاده قرار می گیرد .

بررسی مستقیم FIH1 به روش ایمنوهیستوشیمی به لحاظ اثر تجمعی و پایداری ساختار پروتئین ها و شانس ردیابی آن در سلول کارآمدتر است، اما چون کاهش فاکتور FIH1 هسته ای در مراحل اولیه تشکیل تومور نبود ، بنابراین این پروتئین یک مارکر بیولوژیک در تعیین پیش آگهی تهاجم عروقی (آنژیوژنز) و متاستاز تومور در طبقه بندی مولکولی سرطان کولون نیست .

با توجه به اینکه تعیین مارکرهای بیولوژیک پیش آگهی دهنده، در ارزیابی و تصمیم گیری صحیح مدیریت بیماری و حتی ایجاد روش های نوین درمان سرطان ها بر اساس بیولوژی تومور موثر است ،پیشنهاد می شود در مطالعات بعدی ژن PTEN مورد بررسی شود ،همچنین میزان بیان SOCS3 در سلول توموری به روش ایمنوهیستوشیمی نیز مورد بررسی قرار گیرد .

برای مطالعات تکمیلی پیشنهاد می شود:

۱- آنالیز موتاسیون ژن KRAS بیماران این مطالعه به روش سانجر و مقایسه با روش پائروسکوئسنسینگ

۲- بررسی ایمنوهیستوشیمی ژن SOCS3 در بیماران KRAS موتانت

۳- بررسی بیان ژن FIH1 ، SOCS3 بر روی نمونه بافت تازه (Fresh) کولون

۴- بررسی بیان ژن PTEN در بیماران KRAS^{mut} و KRAS^{wild}

۱. Wied U, Nilsson T, Knudsen J, Sprechler M, Johansen A. Postoperative survival of patients with potentially curable cancer of the colon. *Diseases of the Colon & Rectum*. 1985;28(5):333-5.
۲. Noffsinger A, Lantz P. *Gastrointestinal pathology-an atlas and text*. 2008.
۳. Tsiatis AC, Norris-Kirby A, Rich RG, Hafez MJ, Gocke CD, Eshleman JR, et al. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2010;12(4):425-32.
۴. Veerappan SG, O'Morain CA, Monson JR. Sleisenger and Fordtran's *Gastrointestinal and Liver Disease. Pathophysiology/Diagnosis/Management*. *Diseases of the Colon & Rectum*. 2007;50(11):2001-2.
۵. Geboes K, Ectors N, Geboes KP. Pathology of early lower GI cancer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2005;19(6):963-78.
۶. Ansari R, Mahdavinia M, Sadjadi A, Nouraie M, Kamangar F, Bishehsari F, et al. Incidence and age distribution of colorectal cancer in Iran: Results of a population-based cancer registry. *Cancer Letters*. 2012;240(1):143-7.
۷. Burt RW, Barthel JS, Dunn KB, David DS, Drelichman E, Ford JM, et al. Colorectal cancer screening. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2010;۶۱-۸:(۱)۸;
۸. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins basic pathology*: Elsevier Health Sciences; 2012.
۹. Pahlavan PS, Kanthan R. The epidemiology and clinical findings of colorectal cancer in Iran. *Women*. 2006;86:43.0.
۱۰. Harnack L, Nicodemus K, Jacobs DR, Folsom AR. An evaluation of the Dietary Guidelines for Americans in relation to cancer occurrence. *The American journal of clinical nutrition*. 2002;76(4):889-96.
۱۱. Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *The Lancet*. 2003;361(9368):1496-501.
۱۲. Kuper H, Boffetta P, Adami HO. Tobacco use and cancer causation: association by tumour type. *Journal of internal medicine*. 2002;252(3):206-24.
۱۳. Rothwell PM, Wilson M, Elwin C-E, Norrving B, Algra A, Warlow CP, et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *The Lancet*. 2010;376(9754):1741-50.

- .١٤ Jeter JM, Kohlmann W, Gruber SB. Genetics of colorectal cancer. *Oncology*. 2006;20(3):269-76.
- .١٥ Corman ML. *Colon and Rectal Surgery*: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
- .١٦ Grady WM, Markowitz SD. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annual review of genomics and human genetics*. 2002;3(1):101-28.
- .١٧ Huh JW, Kim YJ. Novel markers for the prognosis of colon cancer patients. *Journal of Surgical Oncology*. 2010;102(3):297.–
- .١٨ Kornprat P ,Pollheimer MJ, Lindtner RA, Schlemmer A, Rehak P, Langner C. Value of tumor size as a prognostic variable in colorectal cancer: a critical reappraisal. *American journal of clinical oncology*. 2011;34(1):43-9.
- .١٩ Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robbins and cotran pathologic basis of disease, Professional Edition: Expert Consult-Online: Elsevier Health Sciences*; 2014.
- .٢٠ Bleeker W, Hayes V, Karrenbeld A, Hofstra R, Hermans J, Buys C, et al. Impact of KRAS and TP53 mutations on survival in patients with left-and right-sided Dukes' C colon cancer. *The American journal of gastroenterology*. 2000;95(10):2953-7.
- .٢١ Yokoyama NN, Pate S, Sprowl ML. patients with left-and right-sided Dukes'C colon cancer. *Am J Gastroenterol* 25 KT Waterman 2.95 SRC - GoogleScholar:2953-7.
- .٢٢ O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(19):1420-5.
- .٢٣ Chen S, Xue Y, Wu X, Le C, Bhutkar A ,Bell EL, et al. Global microRNA depletion suppresses tumor angiogenesis. *Genes & development*. 2014;28(10):1054-67.
- .٢٤ Dhillon A, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007;26(22):3279-90.
- .٢٥ Sasamoto H, Nagasaka T ,Notohara K, Takeda M, Kimura K, Kambara T, et al. Colorectal cancer with mutation in BRAF, KRAS and wild-type with respect to both oncogenes showing different patterns of DNA methylation. *Cancer Research*. 2005;65(9 Supplement):201.–
- .٢٦ Müller A, Fishel R. Mismatch repair and the hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC). *Cancer investigation*. 2002;20(1):102-9.
- .٢٧ Kida H, Ihara S, Kumanogoh A. Involvement of STAT3 in immune evasion during lung tumorigenesis. *Oncoimmunology*. 2013;2(1.(
- .٢٨ Wu WK, Wang XJ, Cheng AS, Luo MX, Ng SS, To KF, et al. Dysregulation and crosstalk of cellular signaling pathways in colon carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;86(3):251-77.

- ٣٩ Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D457-62.
- ٣٠ Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *The lancet oncology.* 2005;6(5):322-7.
- ٣١ Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S, et al. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer research.* 2007;67(6):2643-8.
- ٣٢ Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53—alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2002;99(14):9433-8.
- ٣٣ Watzinger F, Lion T. KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog). 1999.
- ٣٤ Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene.* 2006;366(1):2-16.
- ٣٥ Normanno N, Rachiglio AM, Lambiase M, Martinelli E, Fenizia F, Esposito C, et al. Heterogeneity of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in metastatic colorectal cancer and potential effects on therapy in the CAPRI GOIM trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO.* 2015;26(8):1710-4.
- ٣٦ Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
- ٣٧ Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research.* 2000;28(1):235-42.
- ٣٨ Chen WS, Lazar CS, Poenie M, Tsien RY, Gill GN, Rosenfeld MG. Requirement for intrinsic protein tyrosine kinase in the immediate and late actions of the EGF receptor. *Nature.* 1987;328(6133):820-3.
- ٣٩ Baselga J, Arteaga CL. Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2005;23(11):2445-59.
- ٤٠ Linardou H, Dahabreh IJ, Kanakloupiti D, Siannis F, Bafaloukos D, Kosmidis P, et al. Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *The lancet oncology.* 2008;9(10):962-72.
- ٤١ Muhammad S, Jiang Z, Liu Z, kaur K, Wang X. The role of EGFR monoclonal antibodies (MoABs) cetuximab/panitumab, and BRAF inhibitors in BRAF mutated colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology.* 2012;4(1):72-81.

- .۴۲ Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, et al. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(22):323.Y- •
- .۴۳ Tan C, Du X. KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2012;18(37):5171.
- .۴۴ Markman B, Javier Ramos F, Capdevila J, Tabernero J. EGFR and KRAS in colorectal cancer. *Advances in clinical chemistry*. 2010;51:72.
- .۴۵ Mannan A, HAHN-STRÖMBERG V. K-ras mutations are correlated to lymph node metastasis and tumor stage, but not to the growth pattern of colon carcinoma. *Apmis*. 2012;120(6):459-68.
- .۴۶ Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature Reviews Cancer*. 2009;9(11):798-809.
- .۴۷ Rigby R, Simmons J, Greenhalgh C, Alexander W, Lund P. Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) limits damage-induced crypt hyper-proliferation and inflammation-associated tumorigenesis in the colon. *Oncogene*. 2007;26(33):4833-41.
- .۴۸ Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7(1):41-51.
- .۴۹ Matsumoto S, Hara T, Mitsuyama K, Yamamoto M, Tsuruta O, Sata M, et al. Essential roles of IL-6 trans-signaling in colonic epithelial cells, induced by the IL-6/soluble-IL-6 receptor derived from lamina propria macrophages, on the development of colitis-associated premalignant cancer in a murine model. *The journal of immunology*. 2010;184(3):1543-51.
- .۵۰ Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science*. 2004;117(8):1281-3.
- .۵۱ Furqan M, Mukhi N, Lee B, Liu D. Dysregulation of JAK-STAT pathway in hematological malignancies and JAK inhibitors for clinical application. *Biomarker Research*. 2013;1(1):1-10.
- .۵۲ Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia and cancer. *Journal of molecular medicine*. 2007;85(12):1301-7.
- .۵۳ Brahimi-Horn C, Pouyssegur J. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bulletin du cancer*. 2006;93(8):10073-80.
- .۵۴ Semenza GL. Hypoxia and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2007;26(2):223.
- .۵۵ Mazure NM, Brahimi-Horn MC, Berta MA, Benizri E, Bilton RL, Dayan F, et al. HIF-1: master and commander of the hypoxic world: a pharmacological approach to its regulation by siRNAs. *Biochemical pharmacology*. 2004;68(6):971-80.

- Δϕ Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes & development*. 2001;15(20):2675-86.
- ΔΥ Morris M, Maina E, Morgan N, Gentle D, Astuti D, Moch H, et al. Molecular genetic analysis of FIH-1, FH, and SDHB candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma. *Journal of clinical pathology*. 2004;57(7):706-11.
- ΔΛ Tan EY, Campo L, Han C, Turley H, Pezzella F, Gatter KC, et al. Cytoplasmic location of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor is associated with an enhanced hypoxic response and a shorter survival in invasive breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2007;9(6):R89.
- Δϑ Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Pezzella F, Turley H, Sivridis E, Bouros D, et al. Expression of prolyl-hydroxylases PHD-1, 2, and 3 and of the asparagine hydroxylase FIH in non-small cell lung cancer relates to an activated HIF pathway. *Cancer letters*. 2008;262(1):87-93.
- ϕ• Couvelard A, Deschamps L, Rebours V, Sauvanet A, Gatter K, Pezzella F, et al. Overexpression of the oxygen sensors PHD-1, PHD-2, PHD-3, and FIH is associated with tumor aggressiveness in pancreatic endocrine tumors. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(20):6634-9.
- ϕ\ Burkitt K, Chun SY, Dang DT, Dang LH. Targeting both HIF-1 and HIF-2 in human colon cancer cells improves tumor response to sunitinib treatment. *Molecular cancer therapeutics*. 2009;8(5):1148-56.
- ϕΥ QUINTENS B. The role of hypoxia in colon cancer cell resistance to cytotoxic antitumour agents and modulation of Hypoxia-inducible factor-1 as a strategy to circumvent chemoresistance: Department of Structural and Functional Biology, University of Insubria; 2009.
- ϕΥ Onnis B, Rapisarda A, Melillo G. Development of HIF-1 inhibitors for cancer therapy. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(12):2780-6.
- ϕϕ Baba Y, Nosho K, Shima K, Irahara N, Chan AT, Meyerhardt JA, et al. HIF1A overexpression is associated with poor prognosis in a cohort of 731 colorectal cancers. *The American journal of pathology*. 2010;176(5):2292-301.
- ϕΔ Ronaghi M, Elahi E. Pyrosequencing for microbial typing. *Journal of Chromatography B*. 2002;782(1):67-72.
- ϕϕ Kim JH, Kang GH. Molecular and prognostic heterogeneity of microsatellite-unstable colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2014;20(15):4230-43.
- ϕΥ Vasseur S, Tomasini R, Tournaire R, Iovanna JL. Hypoxia Induced Tumor Metabolic Switch Contributes to Pancreatic Cancer Aggressiveness. *Cancers (Basel)*. 2010;2(4):2138-52.
- ϕΛ Wang Y, Lei F, Rong W, Zeng Q, Sun W. Positive feedback between oncogenic KRAS and HIF-1 α confers drug resistance in colorectal cancer. *OncoTargets and therapy*. 2015;8:1229-37.

- ٢٩ Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome research*. 2001;11(1):3-11.
- ٣٠ Sundström M, Edlund K, Lindell M, Glimelius B, Birgisson H, Micke P, et al. KRAS analysis in colorectal carcinoma: Analytical aspects of Pyrosequencing and allele-specific PCR in clinical practice. *BMC Cancer*. 2010;10:660.
- ٣١ Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Yan L, Cantor M, Namgyal C, et al. Sensitive Sequencing Method for KRAS Mutation Detection by Pyrosequencing. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2005;7(3):413-21.
- ٣٢ Bishehsari F, Mahdavinia M, Malekzadeh R, Verginelli F, Catalano T, Sotoudeh M, et al. Patterns of K-ras mutation in colorectal carcinomas from Iran and Italy (a Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale study): influence of microsatellite instability status and country of origin. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2006;17 Suppl 7:vii91-6.
- ٣٣ Kodaz H, Hacibekiroglu I, Erdogan B, Turkmen E, Tozkir H, Albayrak D, et al. Association between specific KRAS mutations and the clinicopathological characteristics of colorectal tumors. *Molecular and Clinical Oncology*. 201٨٩-١٧٩:(١)٣;٥
- ٣٤ Gonsalves WI, Mahoney MR, Sargent DJ, Nelson GD, Alberts SR, Sinicrope FA, et al. Patient and tumor characteristics and BRAF and KRAS mutations in colon cancer, NCCTG/Alliance N0147. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014;106(7):٧٥٠-٧٥٦.
- ٣٥ Zhang J, Zheng J, Yang Y, Lu J, Gao J, Lu T, et al. Molecular spectrum of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in Chinese colorectal cancer patients: analysis of 1,110 cases. *Scientific reports*. 2015;5.
- ٣٦ Li Y, Ye D. Cancer therapy by targeting hypoxia-inducible factor-1. *Current cancer drug targets*. 2010;10(7):782-96.
- ٣٧ Wang E, Zhang C, Polavaram N, Liu F, Wu G, Schroeder MA, et al. The role of factor inhibiting HIF (FIH-1) in inhibiting HIF-1 transcriptional activity in glioblastoma multiforme. *PloS one*. 2014;9(1):e86102.
- ٣٨ Liu CJ, Tsai MM, Hung PS, Kao SY, Liu TY, Wu KJ, et al. miR-31 ablates expression of the HIF regulatory factor FIH to activate the HIF pathway in head and neck carcinoma. *Cancer Res*. 2010;70(4):1635-44.
- ٣٩ Weber A, Hengge UR, Bardenheuer W, Tischoff I, Sommerer F, Markwarth A, et al. SOCS-3 is frequently methylated in head and neck squamous cell carcinoma and its precursor lesions and causes growth inhibition. *Oncogene*. 2005;24(44):6699-708.
- ٤٠ Chen T, Yao L-Q, Shi Q, Ren Z, Ye L-C, Xu J-M, et al. MicroRNA-31 contributes to colorectal cancer development by targeting factor inhibiting HIF-1 α (FIH-1). *Cancer biology & therapy*. 2014;15(5):516-23.

- ٨١ Schnekenburger M, Diederich M. Epigenetics offer new horizons for colorectal cancer prevention. *Current colorectal cancer reports*. 2012;8(1):66-81.
- ٨٢ Wang C-J, Stratmann J, Zhou Z-G, Sun X-F. Suppression of microRNA-31 increases sensitivity to 5-FU at an early stage, and affects cell migration and invasion in HCT-116 colon cancer cells. *BMC cancer*. 2010;10(1):1.
- ٨٣ Wang C-J, Zhou Z-G, Wang L, Yang L, Zhou B, Gu J, et al. Clinicopathological significance of microRNA-31,-143 and-145 expression in colorectal cancer. *Disease markers*. 2009;26(1):27-34.
- ٨٤ Li W, Qiu T, Zhi W, Shi S, Zou S, Ling Y, et al. Colorectal carcinomas with KRAS codon 12 mutation are associated with more advanced tumor stages. *BMC Cancer*. 2015;15.
- ٨٥ Sinicrope FA, Shi Q, Smyrk TC, Thibodeau SN, Dienstmann R, Guinney J, et al. Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. *Gastroenterology*. 2015;148(1):88-99.
- ٨٦ Chun SY, Johnson C, Washburn JG, Cruz-Correa MR, Dang DT, Dang LH. Oncogenic KRAS modulates mitochondrial metabolism in human colon cancer cells by inducing HIF-1a and HIF-2a target genes. *Mol Cancer*. 2010;9(1):293.
- ٨٧ Cao D, Hou M, Guan Y-s, Jiang M, Yang Y, Gou H-f. Expression of HIF-1alpha and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications. *BMC cancer* . ٢٠٠٩;٩(١):٢٣٢.
- ٨٨ Kikuchi H, Pino MS, Zeng M, Shirasawa S, Chung DC. Oncogenic KRAS and BRAF differentially regulate hypoxia-inducible factor-1 α and-2 α in colon cancer. *Cancer research*. 2009;69(21):8499-506.
- ٨٩ Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA ,Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes & development*. 2002;16(12):1466-71.
- ٩٠ Mitelman F, Mertens F, Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nature genetics*. 1997;15:417-74.
- ٩١ Bigner SH, Vogelstein B. Cytogenetics and molecular genetics of malignant gliomas and medulloblastoma. *Brain Pathology*. 1990;1(1):12-8.
- ٩٢ Sawai H, Yasuda A, Ochi N, Ma J, Matsuo Y, Wakasugi T, et al. Loss of PTEN expression is associated with colorectal cancer liver metastasis and poor patient survival. *BMC gastroenterology*. 2008;8(1):56.
- ٩٣ Lisy K. Investigating potential post-translational modification of factor-inhibiting HIF (FIH-1). 2011.

- .٩٤ Stolze IP, Tian Y-M, Appelhoff RJ, Turley H, Wykoff CC, Gleadle JM, et al. Genetic analysis of the role of the asparaginyl hydroxylase factor inhibiting hypoxia-inducible factor (HIF) in regulating HIF transcriptional target genes *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(41):42719-25.
- .٩٥ Chen T, Ren Z, Ye L-C, Zhou P-H, Xu J-M, Shi Q, et al. Factor inhibiting HIF1 α (FIH-1) functions as a tumor suppressor in human colorectal cancer by repressing HIF1 α pathway. *Cancer biology & therapy*. 2015;16(2):244-52.
- .٩٦ Chen T, Yao LQ, Shi Q, Ren Z, Ye LC, Xu JM, et al. MicroRNA-31 contributes to colorectal cancer development by targeting factor inhibiting HIF-1 α (FIH-1). *Cancer biology & therapy*. 2014;15(5):516-23.
- .٩٧ Li Y, de Haar C, Chen M, Deuring J, Gerrits MM, Smits R, et al. Disease-related expression of the IL6/STAT3/SOCS3 signalling pathway in ulcerative colitis and ulcerative colitis-related carcinogenesis. *Gut*. 2010;59(2):227-35.
- .٩٨ Hamilton KE, Lund PK, Galanko JA, Sandler RS, Keku TO. Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) is not an independent biomarker of colorectal adenoma risk. *BMC research notes*. 2010;3(1):144.

**KRAS Analysis & Gene Expression & Immunohistochemical Evaluation of
HIF1AN protein as a Probable Prognostic Biomarker in
Human Colorectal Adenocarcinoma**

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is a multistep process based on the accumulation of somatic mutations in genes such as APC and KRAS. Data on the presence of mutations in KRAS gene in CRC and their relationship with clinicopathological parameters and expression of genes involved in tumor progression are scarce. We examined the KRAS status in 99 patient's samples and its correlation with clinicopathological parameters such as age, sex, tumor location, lymph node metastasis, tumor stage, tumor grade and vascular invasion. In consistent with other's reports, 38.4% of our samples showed KRAS mutation in their genomes with preferential mutation in codon 12 (89.4%). Nevertheless, in contradict with previous reports, we were not seen any correlation between KRAS status and clinicopathological parameters ($P>0.05$) except vascular invasion. Patients with KRAS mutation have more vascular invasion compared with patient having wild-type KRAS. Next, we investigated the expression of two tumor suppressor genes, FIH-1 and SOCS3, in both KRAS mutant and wild-type groups and looked for any correlation between their expression and clinicopathological parameters. Although the expression of both genes have showed irregulation expression, but none of the clinicopathological parameters were associated with the expression of FIH-1 and SOCS3 at mRNA level ($P>0.05$). However, decline in FIH-1 expression at protein level in KRAS mutant group was correlated with stage IV and grade 2 of tumor ($P\leq 0.05$). Our results demonstrated that there are no or low correlation between KRAS status, FIH-1 and SOCS3 expression, and epidemiologic and clinicopathologic characteristics in CRC.

Keywords: Colorectal Cancer, KRAS mutation, FIH-1 and SOCS3.

The Relationship between Factor inhibiting HIF-1-alpha (HIF1AN) Expression and Vascular Invasion in Colon Adenocarcinoma

R. Najafipour *

N. Rakhshani**

L. Vakil*,**

F. Zamani**

A. Morakabati***

A. Javadi****

*Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, IR Iran

**GI and Liver Disease Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

***Molecular Pathology Department of Mehr General Hospital, Tehran, Iran

****Department of Medical Informatics, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Background: lack of oxygen (Hypoxia) is a common phenomenon in human solid tumors which leading to tumor growth, survival and metastasis by induction of angiogenesis.

Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Subunit Inhibitor (HIF1AN) □by binding to transcription co-activators (CBP / P300) inhibits the hypoxia inducible factor alpha (HIF1α).

Goal: This study was performed to determine the relationship between the expression of HIF1AN and vascular invasion in colon adenocarcinoma.

Method and Material : This analytical study was conducted on 101 patients with colon adenocarcinoma which were divided to vascular invasion tumor and Non- vascular invasion tumor groups. Immunohistochemical staining of tissues were done by using monoclonal anti - HIF1AN antibody.

cell staining intensity was assessed and the correlation between the HIF1AN expression levels and pathological parameters were surveyed.

Data were analyzed with logistic regression and chi-square test with p-value <0.05.

Findings: HIF1AN Nuclear immunoreactivity were different between two groups .Low expression of HIF1AN was associated with tumor vascular invasion (P=0.01).

No association between tumor differentiation , depth and HIF1AN expression was observed .

Conclusion: Evidence showed that the low expression or incorrect positioning of HIF1AN in nucleus of tumor cells causes HIF1α inhibition failure and increase the angiogenic associated factors. The HIF1AN plays a role as an tumor suppressor gene (TSG)in colon tumors and decreased HIF1AN expression in nucleus of colon cancer cells is associated with angiogenesis factors and vascular invasion.

Keywords: Angiogenesis, Vascular Invasion, HIF1AN, Colorectal Adenocarcinoma

Citation: Najafipour R, Rakhshani N, Vakil L, Zamani F, Morakabati A, Javadi A. The Relationship between Factor inhibiting HIF-1-alpha (HIF1AN) Expression and Vascular Invasion in Colon Adenocarcinoma by immunohistochemistry. J Qazvin Univ Med Sci. 2016; 20 (4):

Corresponding Address: Ladan Vakil, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Email: ladanamor@gmail.com

رتباط بیان مهارکننده عامل القاشونده هیپوکسی با میزان تهاجم عروقی

در سرطان روده بزرگ

دکتر رضا نجفی پور* دکتر ناصر رخشانی** لادن وکیل** و** دکتر فرهاد زمانی**

دکتر آرمان مرکباتی*** امیر جوادى****

* مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

** مرکز تحقیقات کبد و گوارش دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

*** بخش آسیب شناسی مولکولی بیمارستان مهر تهران، تهران، ایران

**** بخش انفورماتیک پزشکی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده:

زمینه: کمبود فشار اکسیژن (هیپوکسی) یک پدیده شایع در تومورهای انسانی است که با افزایش القای فرآیند رگ زایی (آنژیوژنیزیس) موجب رشد، بقا و تهاجم تومور می گردد. عامل مهارکننده عامل القاشونده هیپوکسی (HIF1AN) با اتصال به یک سری فعال کننده های نسخه برداری (CBP/P300) موجب مهار عامل القا شونده هیپوکسی ($HIF1\alpha$) می شود.

هدف: به منظور، تعیین رابطه بین بیان HIF1AN و تهاجم عروقی در تومور آدنوکارسینوم روده بزرگ انجام شد.

مواد و روش: این مطالعه تحلیلی در سال های ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۳ بر روی ۱۰۱ بیمار مبتلا به سرطان کولون در دو گروه دارا و فاقد تهاجم عروقی انجام شد. رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی بافت ها با استفاده از مونوکلونال آنتی بادی ضد HIF1AN انجام شد.

شدت رنگ پذیری سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت و ارتباط میزان بیان نشانگر HIF1AN با شاخص های آسیب شناسی بررسی شد.

داده ها با آزمون های همبستگی و مجذور کای و سطح معنی داری کم تر از ۰/۰۵ آنالیز شد.

یافته ها : واکنش ایمنوشیمیایی HIF1AN در دو گروه مورد مطالعه متفاوت بود . بین میزان بیان کم HIF1AN با تومور تهاجم عروقی ارتباط داشت. ($P=0/01$) هیچ ارتباطی بین تمایز تومور ، عمق و بیان HIF1AN مشاهده نشد..

نتیجه گیری و بحث: شواهد نشان داد کاهش بیان و یا جای گیری نا مناسب HIF1AN در هسته سلول های بدخیم موجب نارسایی مهار عامل $HIF1\alpha$ و افزایش عوامل مرتبط با رگ زایی تومور می شود . پروتئین HIF1AN در سرطان روده نقش مهار گر تومور دارد و کاهش بیان HIF1AN در هسته سلول های سرطانی کولون با عوامل رگ زایی (آنژیوژنز) و تهاجم عروقی ارتباط دارد.

کلید واژه ها : تهاجم عروقی , رگ زایی , مهارکننده فاکتور القا شونده هیپوکسی (HIF1AN) , سرطان کولون



به نلم خدا

صور تجلیه دفاع از پایان نامه
فرم شماره (۳)

معاون محترم پژوهشی دانشکده پزشکی:

یا سلام،

با سلام،
بدینوسیله به استحضار می رساند پایان نامه دانشجویی/ تخصصی با عنوان تاثیر عوامل اجتماعی و اقتصادی بر رفتار مصرف کننده در رشته روانشناسی و نام خانوادگی میرزا علی محمد در تاریخ ۱۳۹۸/۰۵/۰۵ به این مرکز ارسال گردید و پس از بررسی و تصدیق به ثبت آن در این مرکز، به شما اطلاع می دهد. خواهشمند است در صورت لزوم، اقدامات لازم را در خصوص تکمیل فرم های مربوطه و ارسال آن به این مرکز، در اسرع وقت انجام دهید. با تشکر و احترام،
رئیس مرکز

یہ راجنیاں سرکار خانہ / جناب

معلق به خانم / آقای دکتر
در تاریخ ۹۸/۲/۲۹ دفاع گردید و با نمره ۱۹/۲۸
آقای دکتر نجفی مؤید قبول مینت داوران نامبرده در ذیل قرار گرفت
معادل نمره ۱۹/۲۸

مهر و امضاء هیئت داوران:

مهر و امضاء استاد / اساتید
راهنما:

مهر و امضای استاد / اساتید
مشاور:

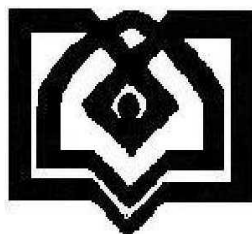
مهر و امضاء اساتید داور:

معاون پژوهشی گروه / نماینده ایشان (ناظر)

مدیر گروه

* یادآوری : مطابق آیه نامه، جلسه دفاعیه هنگامی اعتبار دارد که حداقل نصف پهلوه یک عضو هیئت داوران در جلسه حضور داشته باشند (حضور اساتید راهنما و مشاور و معاون پژوهشی گروه / ناظر در جلسه دفاع الزامی است).
عذر اعلام شده، معدل نمرات در جلسه دفاعیه است [اساتید راهنما، اساتید مشاور، داوران و معاون پژوهشی گروه / نماینده هیأت] که توسط معاون پژوهشی گروه / نماینده هیأت (ناظر) تعیین و به دانشکده اعلام می‌شود.

Qazvin University of Medical Sciences



**KRAS Analysis and Gene Expression and Immunohistochemical
Evaluation of HIF1AN protein as a Probable Prognostic Biomarker
in Human Colorectal Adenocarcinoma**

Supervisors

Dr Reza Najafipour

Dr Nasser Rakhshani

Advisors

Dr Arman Morakabati

Dr Amir Javadi

Student

Ladan Vakil